

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE
NANOPARTİKÜLER KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖR
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Nagihan UĞURLU

**Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2021**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE
NANOPARTİKÜLER KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖR
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Nagihan UĞURLU

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Selma ŞAHİN

ANKARA

2021

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****DIYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE
NANOPARTİKÜLER KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖR
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ****Nagihan Uğurlu****Danışman: Prof. Dr. Selma Şahin**

Bu tez çalışması 15.04.2021 tarihinde jürimiz tarafından “Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Levent Öner*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Sevgi Takka*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Sibel Pehlivan*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr Hakan Eroğlu*
Hacettepe Üniversitesi

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Diclehan ORHAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibarenertelenmiştir. (1)
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden ertelenmiştir. (2)
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

15 /04/2021

Nagihan Uğurlu

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Selma şahin danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Nagihan Uğurlu

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her aşamada destek olan ve yol gösteren değerli Hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Selma Şahin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince desteğini gördüğüm Dr. Ebru Erdal'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince sağladıkları imkanlar ve tüm destekleri için Prof. Dr. Levent Öner'e ve Prof. Dr. Sema Çalış'a ve tüm Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim dalı ailesine teşekkür ederim. Tez izleme komitesinde yer alan hocam Prof. Dr. Levent Öner'e ve Prof. Dr. Sevgi Takka'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecim boyunca desteklerini gördüğüm Ecz. Aslıhan Aslan'a, Dr. Nihan İzat'a ve Dr. Tuba Gülsün Ünal'a ve tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarının *in vivo* kısmında desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Okan Ekim, Doç. Dr. Murat Demirbilek, Vet. Hekim Barış Batur ve Dr. Soheil Maleghasemi'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında destek olan Prof. Dr. Ahmet Şengün, Dr. Elif İnci Erbahçeci, Dr. Ayşe Güzin Taşlıpınar Uzel'e ve Doç. Dr. Zuhale Özen Tunay'a teşekkür ederim.

Tez çalışmasında verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde destek olan Doç. Dr. Selcen Yüksel'e teşekkür ederim.

Annem Saadet Orhan, babam Cemal Orhan'a ve kardeşlerime, doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca sağladıkları sevgi ve huzur dolu ortam için teşekkür ederim.

Eşim Mahmut Uğurlu ve çocuklarım Ahmet Said, Elif Ayşe ve Alaaddin Ömer'e doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince gösterdikleri sonsuz sabır için teşekkür ederim.

Tez kapsamındaki *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarımı yürütmem için imkan sağlayan AYBÜ İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ve ekibine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı yürütmem için proje desteği sağlayan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne (Proje Numarası:3087-184) teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Uğurlu N. Diyabetik Maküler Ödem Tedavisinde Nanopartiküler Karbonik Anhidraz İnhibitör Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı, Doktora Tezi, Ankara, 2021. Diyabetik Retinopati (DRP), diyabete bağlı olarak gözün retina tabakasında gelişen tüm yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin oluşturduğu klinik bir tablodur. Dünyada 20-74 yaş arasındaki körlüklerin en önemli sebebi olan DRP tedavisinde altın standart tedavi seçeneği intravitreal enjeksiyonlardır. Tez çalışmaları kapsamında; DRP tedavisinde kullanılmak üzere intravitreal yolla uygulanacak asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül (ACZ-CD-NP) formülasyonları geliştirilmiş ve bu nanopartiküllerin salım ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen ve karakterize edilen ACZ-CD-NP'lerin *in vitro* ve *in vivo* DRP hastalık modelinde etkinliği ve toksisitesi incelenmiştir. *In vitro* etkinlik, HRMEC hücre hattında geliştirilmiş DRP hastalık modelinde, TEER testleri ve geçirgenlik testleri ile değerlendirilmiştir. *In vivo* çalışmalar kapsamında, DRP hastalık modeli oluşturulmuş tavşan gözlerinde intravitreal ACZ-CD-NP uygulamasının tedavi edici etkisi, fundus muayenesi, renkli fundus fotoğrafı (RFF), Optik Koherens Tomografi (OKT), Fundus Fluoresein Anjiyografi (FFA) ve Fundus Florofotometri (FFFM) tetkikleri ile değerlendirilmiştir. *In vitro* toksisite, HRMEC hücre hattında yapılan MTT testi ile değerlendirilmiş, *in vivo* toksisite çalışmaları kapsamında da intravitreal ACZ-CD-NP uygulanan tavşanlarda ön segment ve arka segment muayene sonuçları ve göz içi basıncı ölçümleri değerlendirilmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde intravitreal ACZ-CD-NP uygulamasının DRP hastalık modelinde anlamlı düzeyde tedavi edici etki gösterdiği ve göz dokuları için herhangi bir toksik etkiye yol açmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: asetazolamid, diyabetik retinopati, intravitreal enjeksiyon, nanopartikül, siklodekstrin

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 3087-184).

ABSTRACT

Uğurlu N. Evaluation of Nanoparticulate Carbonic Anhydrase Inhibitor Effectiveness in the Treatment of Diabetic Macular Edema. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences PhD. Thesis in Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Ankara, 2021. Diabetic Retinopathy (DRP) is a clinical picture formed by all structural and functional changes in the retinal layer of the eye due to diabetes. Intravitreal injections are the gold standard treatment option for DRP, which is the most important cause of blindness in the world between the ages of 20-74. Within the scope of thesis studies; for the treatment of DRP, acetazolamide loaded cyclodextrin nanoparticle (ACZ-CD-NP) formulations to be applied intravitreally have been developed and the release and characterization studies of these nanoparticles have been carried out. The efficacy and toxicity of developed and characterized ACZ-CD-NPs have been investigated in *in vitro* and *in vivo* DRP disease model. *In vitro* efficacy was evaluated by TEER tests and permeability tests in the DRP disease model developed in the HRMEC cell line. Within the scope of *in vivo* studies, the therapeutic effect of intravitreal ACZ-CD-NP application have been evaluated in rabbit eyes with a DRP disease model by fundus examination, color fundus photography (CFF), Optical Coherence Tomography (OCT), Fundus Fluorescein Angiography (FFA) and Fundus Fluorophotometry (FFFM). *In vitro* toxicity was evaluated with the MTT test performed on HRMEC cell line, and within the scope of *in vivo* toxicity studies, anterior segment and posterior segment examination results and intraocular pressure measurements were evaluated in rabbits treated with intravitreal ACZ-CD-NP. When the results obtained from the studies were evaluated, it was determined that the intravitreal application of ACZ-CD-NP showed a significant therapeutic effect in the DRP disease model and did not cause any toxic effects on the eye tissues.

Key words: acetazolamide, diabetic retinopathy, intravitreal injections, nanoparticles, cyclodextrin.

Supporting organizations: This study was supported by Ankara Yıldırım Beyazıt University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 3087-184).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Göz ve Görme	3
2.2. Göz Anatomisi	3
2.2.1. Retina	4
2.2.2. Maküla	6
2.2.3. Retinanın Dolaşım Sistemi	7
2.2.4. Görme	10
2.3. Diyabetik Retinopati	11
2.3.1. Diyabetik Retinopati Etiyopatogenezi	12
2.3.2. Diyabetik Retinopatide Klinik Bulgular	15
2.3.3. Diyabetik Retinopatide Görüntüleme Yöntemleri	22
2.4. Diyabetik Retinopatide Tedavi İlkeleri	25
2.4.1. Diyabetik Maküler Ödem Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	26
2.4.2. Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntravitreal Enjeksiyonlara Bağlı Gelişebilecek Yan Etkiler	35
2.4.3. Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntravitreal Enjeksiyonlara Cevapsızlık	38
2.5. Oküler İlaç Taşınımı	39
2.6. Posterior Segmente İlaç Ulaştırma Yolları	39
2.6.1. Topikal Uygulamalar	40

2.6.2.Perioküler Uygulamalar	41
2.6.3.Sistemik Uygulamalar	41
2.6.4. İntravitreal Uygulamalar	41
2.7. Diyabetik Retinopati Tedavisinde Kullanılan Tedavi Seçeneklerinin Kısıtlılıkları	43
2.8. Diyabetik Retinopati Tedavisinde Karşılaşılan Sorunlara Yönelik Çözüm Önerileri	45
2.9. İntravitreal İlaç Taşıma Sistemleri	46
2.10. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	47
2.10.1. İntravitreal Uygulamaya Yönelik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	47
2.10.2. İntravitreal Uygulamaya Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler	49
2.11. İntravitreal Uygulanan Nanopartiküllerin Dağılımı	55
2.12. İntravitreal Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İntravitreal Dağılıma ve Hedef Dokuya Ulaşımında Etkileri	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	59
3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler	59
3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	60
3.3. Deney Hayvan	61
3.4. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu	61
3.4.1. Asetazolamid için Miktar Tayini Yöntemi	61
3.4.2. Analitik Yöntemin Validasyonu	62
3.5. ACZ Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Çalışmalarının Yapılması	64
3.5.1. ACZ Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi	64
3.5.2. ACZ Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	68
3.5.3. Nanopartiküllerin Degredasyon Süresinin Belirlenmesi	70
3.5.4. ACZ Yükleme Oranının ve Salım Profillerinin Belirlenmesi	70
3.6. ACZ Yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin <i>in vitro</i> Sitotoksitesinin ve Etkinliğinin İncelenmesi	71
3.6.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	72

3.6.2. Geliştirilen Siklodekstrin Nanopartiküllerin HRMEC Hücre Hattında Sitotoksitesinin Belirlenmesi	73
3.6.3. HRMEC Hücre Kültüründe Diyabetik Retinopati Modelinin Geliştirilmesi	74
3.6.4. Diyabetik Retinopati Geliştirilmiş Hücre Kültürü Modelinde ACZ Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin TEER Testleri ile Değerlendirilmesi	75
3.6.5. Diyabetik Retinopati Geliştirilmiş Hücre Kültürü Modelinde ACZ Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin Geçirgenlik Testleri ile Değerlendirilmesi	77
3.7. Geliştirilen ACZ yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin <i>in vivo</i> Toksisitesinin ve Etkinliğinin İncelenmesi	79
3.7.1. Deney Havyanı ve Anestezi	80
3.7.2. Tavşanlarda DRP Modelinin Oluşturulması	81
3.7.3. <i>İn vivo</i> Çalışma Planı ve Çalışma Grupları	82
3.7.4. Oftalmoskopik Muayene ve Tetkikler	84
3.7.5. İstatistiksel Analiz	90
4. BULGULAR	92
4.1. Asetazolamid için Miktar Tayini Yöntemi ve Yöntem Validasyonu	92
4.2. Asetazolamid Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Çalışmalarının Yapılması	97
4.2.1. ACZ-PHBV ve ACZ-CD Nanopartiküllerin Geliştirilmesi	97
4.2.2. ACZ-CD ve CD Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	99
4.2.3. Nanopartiküllerin Stabilitesinin/Degradasyon Süresinin Belirlenmesi	103
4.2.4. Siklodekstrin Nanopartiküllere Asetazolamid Yükleme Oranının ve Salım Profilinin Belirlenmesi	105
4.3. Geliştirilen Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinlik ve Güvenilirliğinin <i>In Vitro</i> Değerlendirilmesi	106
4.3.1. CD Nanopartiküllerin İnsan Retinal Mikrovasküler Endotel Hücre Hattı (HRMEC) Üzerine Sitotoksitesinin Belirlenmesi	106
4.3.2. HRMEC Hücre Kültüründe Diyabetik Retinopati (DRP) Modelinin Oluşturulması	108

4.3.3. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin <i>in vitro</i> DRP Modelinde TEER Testleri ile Belirlenmesi	109
4.3.4. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin <i>invitro</i> DRP Modeline Geçirgenlik Testleri İle Belirlenmesi	111
4.4. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin <i>in vivo</i> Etkinliğinin ve Toksisitesinin İncelenmesi	112
4.4.1. Deney Hayvanı	112
4.4.2. Tavşanlarda DRP Modelinin Oluşturulması	113
4.4.3. Oftalmoskopik Muayene ve Tetkikler	116
5. TARTIŞMA	136
5.1. Analitik Yöntem Validasyonu	136
5.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirme Çalışmaları	136
5.2.1. Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi	137
5.2.2. ACZ-CD-NP'lerin Karakterizasyonu	139
5.3. Geliştirilen ACZ-CD NP'lerin Göz Dokularında Toksisitesinin İncelenmesi	145
5.4. Geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin DRP Tedavisinde Etkinliğinin Belirlenmesi	150
5.4.1. <i>İn vitro</i> Etkinlik Çalışmaları	150
5.4.2. <i>İn vivo</i> Etkinlik Çalışmaları	154
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	166
7. KAYNAKÇA	169
8. EKLER	197
9. ÖZGEÇMİŞ	200

SİMGELER VE KISALTMALAR

2HP-β-CD	2-hidroksipropil-β-siklodekstrin
ACZ	Asetazolamid
ACZ-CD-NP	Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül
AQP	Aquaporinler
a-VEGF	Anti-VEGF
CAV-1	Caveolin-1
CD	Siklodekstrinler
dKRB	Dış Kan Retina Bariyeri
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DM	Diyabetes mellitus
DMÖ	Diyabetik Maküler Ödem
DRP	Diyabetik Retinopati
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGDE	Etilen Glikol Diglisidil Eter
ETDRS	Erken Tedavi Çalışma Grubu
EVA	Etilen Vinil Asetat
EVOM2	Epitel Volt/Ohm Metre
FAZ	Foveal Avasküler Zon
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FFA	Fundus Fluoresein Anjiyografi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
FITC	Fluoresein İzotiyosiyanat Dextran
GAG	Glikozaminoglikanlar
GIB	Göz içi basıncı
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen
HP-β-CD	Hydroksipropil-beta-siklodekstrin
HRMEC	İnsan Retina Mikrovasküler Endotelial Hücre
HV	Hidroksivalerat

ILM	İç Limitan Membran
iKRB	İç Kan Retina Bariyeri
İRMA	İntraretinal Mikrovasküler Anomaliler
KAI	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri
KA	Karbonik Anhidraz
KMÖ	Kistoid Maküler Ödem
KRB	Kan Retina Bariyeri
KKS	Plazma Kallikrein Sistemi
MÖ	Maküler Ödem
NPDR	Nonproliferatif Diyabetik Retinopati
NVD	Optik Disk Neovaskülarizasyonu
NVE	Retinada Neovaskülarizasyon
OKT	Optik Koherens Tomografi
PDR	Proliferatif Diyabetik Retinopati
PEDF	Pigment Epitel Kaynaklı Büyüme Faktörü
PHA	Polihidroksialkonatlar
PLA	Polilaktikasit
PLGA	Polilaktikkoglikolik Asit
PVA	Polivinil Alkol
RCT	Randomize Kontrollü Deney
RF	Renkli Fundus Fotoğrafı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
TEER	Transepiteliyal Elektrik Rezistansı
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VH	Vitreus İçi Hemoraji
γCD	Gama Siklodekstrin

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Gözün anatomik ve histolojik yapısı.	3
2.2. Sağlıklı bir kişinin makülasının renkli fundus fotoğrafı (RFF) (A) ve üç boyutlu Optik Koherens Tomografi (OKT) görüntüsü (B).	7
2.3. Oküler dolaşımın anatomisi ve KRB'nin yapısı.	8
2.4. KKS'nin vitreustaki diyabetik retinopati bulgularındaki potansiyel etkilerini gösteren şematik fundus resmi.	15
2.5. Sağlıklı gözde ve PDR ve DMÖ tanısı olan gözde maküla ve retina dokularının gösterilmesi.	16
2.6. DRP'ye bağlı olarak retina damar geçirgenliğinde artışı.	16
2.7. Müller hücre ayaksız uzantılarında AQP akanalları.	20
2.8. Retinada sıvı akışı.	20
2.9. Fundus fluoresein anjiyografi görüntüleri.	23
2.10. Asetazolamidin Yapısı.	31
2.11. Posterior segmente ilaç ulaştırma yolları.	40
2.12. Ön ve arka segmente uygulanan oküler implantlar.	47
2.13. İntravitreal uygulanan nanopartiküllerin oküler dağılımı.	48
2.14. Siklodekstrinin kimyasal yapısı (A) ve moleküler şekli (B).	50
2.15. İnklüzyon kompleksi oluşumu.	50
2.16. İç limitan membran (ILM) ve vitreusun yapısının şematik gösterimi.	56
2.17. İntravitreal uygulanan nanopartiküllerin (aynı boyutta, farklı yüzey yüküne sahip) göz dokularında dağılımının şematik gösterimi.	58
3.1. ACZ salım çalışmalarında kullanılan Franz difüzyon hücresi.	71
3.2. İntravitreal enjeksiyon uygulaması (A) İntravitreal enjeksiyon tekniği (B).	81
3.3. Tavşanların elde taşınabilir dijital biyomikroskopu ile ön segment muayenesi ve görüntülenmesi.	85
3.4. Tavşan gözüne tonometre cihazı ile göz içi basıncı ölçümleri (A ve B).	86
3.5. Tavşan gözünde RFF ve OKT çekimi.	88
3.6. Tavşanlarda FFFM ölçümleri.	90
4.1. Asetazolamidin (0,5mg/mL) 0,1M NH ₄ OH/PBS içerisinde hazırlanan çözeltisinin 220-600 nm dalga boyları aralığında UV spektrumu.	92
4.2. ACZ'nin 0,1M NH ₄ OH/PBS çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi ($\lambda_{max}=294$ nm; $\bar{X} \pm SS$: n=3).	93

4.3. Etkin madde içermeyen salım ortamının (A) ve CD içeren salım ortamının (B) UV spektrumları.	95
4.4. Geliştirilen ACZ-PHBV nanopartiküllerin SEM görüntüsü.	97
4.5. Farklı yöntemlerle geliştirilen (A: Yöntem 1, B: Yöntem 2, C: Yöntem 3, D:Yöntem 4) siklodekstrin nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.	98
4.6. ACZ, CD/ACZ kompleks, CD ve ACZ-CD-NP'lerin FTIR spektrumları	100
4.7. ACZ-CD-NP'lerin partikül büyüklüğü dağılımı (A) ve zeta potansiyel (B) sonuçları.	102
4.8. Yöntem 1 ile hazırlanan ACZ-CD-NP'lerin SEM görüntüleri.	103
4.10. ACZ-CD nanopartiküllerinin PBS (pH 7,4) ortamında in vitro salım profili.	105
4.11. Farklı konsantrasyonlardaki ACZ, CD NP ve ACZ-CD NP HRMEC hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.	107
4.12. VEGF içeren ve içermeyen besiyerinde inkübe edilen HRMEC hücrelerinin TEER değeri değişimleri.	108
4.13. Kontrol grubu ve VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin TEER değerlerinin zamana bağlı olarak değişimi.	110
4.14. Çalışma gruplarının geçirgenlik testlerinden elde edilen değerleri.	112
4.15. 6 numaralı tavşanın, ilk muayene anında sağ gözünden alınan optik disk merkezli (A) ve nasal yarından alınmış fundus görüntülerinde (B) Optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü.	114
4.16. 7 numaralı tavşanın ilk muayene anında optik disk merkezli (A) ve nasal yarından alınmış fundus görüntülerinde (B) Optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü.	115
4.17. 8 numaralı tavşanın optik disk merkezli (A) ve nasal yarından alınmış fundus görüntülerinde (B) optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü.	116
4.18. Her gruptan temsili bir tavşanın çalışma süresince alınan ön segment fotoğrafları.	117
4.19. Çalışma gruplarında yer alan tavşanların, çalışma süresince yapılan takip muayenelerinde gruptardan elde edilen GIB ölçümlerinin (mmHg) ortanca değerlerinin zamana bağlı değişimi.	119
4.20. Çalışma gruplarında yer alan tavşanların, çalışma süresince yapılan takip muayenelerinde elde edilen bulgular.	120
4.21. Yeni Damar Oluşumunun takibinde kullanılan derecelendirme sistemi.	122
4.22. Grupların DRP bulgularının çalışma boyunca değişimi.	126
4.23. Tavşan gözünde alınan OCT kesitinin retinada tekabül ettiği alanın gösterimi.	126

- 4.24.** Çalışma gruplarında yeralan tavşanların çalışma süresince 1., 2., 3. ve 4. ölçüm zamanlarında OKT ile ölçülen retina kalınlıkları. 129
- 4.25.** FFA görüntülerinde, optik diskten ve meduller kanatlardaki retinal damarlardan olan fluoresein sızıntının düzeyinin değerlendirilmesi. 130
- 4.26.** Grupların FFA derecelerinin çalışma süresince değişimi. 133
- 4.27.** Grupların FFFM ölçümlerinin ortanca değerlerinin çalışma süresince değişimi. 135

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Doğal siklodekstrinlerin yapısı.	49
2.2. Oküler ilaç taşınımı için için siklodekstrin içeren formülasyon örnekleri.	53
3.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri.	68
3.2. TEER çalışmaları kapsamında, incelenen gruplar ve çalışma planı.	76
3.3. Geçirgenlik çalışmaları kapsamında, incelenen gruplar ve çalışma planı.	78
3.4. <i>İn vivo</i> çalışmalar kapsamında belirlenen gruplar ve takip edilmiş iş planı.	84
4.1. ACZ miktar tayini için gün içi doğruluk sonuçları.	94
4.2. ACZ miktar tayin yönteminin gün içi kesinlik sonuçları.	94
4.3. ACZ miktar tayin yönteminin günler arası kesinlik sonuçları.	95
4.4. ACZ'nin miktar tayin yöntemi için stabilite test sonuçları.	96
4.5. Geliştirilen NP'lerin boyut dağılımları, polidispersite indeksleri (PDI) ve zeta potansiyel değerleri.	99
4.6. Farklı konsantrasyonlardaki serbest ACZ, CD-NP ve ACZ-CD-NP nanopartiküllerin HRMEC üzerine sitotoksik etkileri.	107
4.7. TEER ölçümleri yapılan 2 grubun (HRMEC ve VEGF ile etkileştirilen HRMEC) çalışma süresince 0., 4., 12. ve 24. saat ölçüm zamanlarında Evom2 ile ölçülen TEER değerlerinin (ohm.cm^2) ortalama, standart sapma, standart hata ve medyan değerleri.	109
4.8. Kontrol grubu ve VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelerde tayin edilen TEER değerleri.	110
4.9. Geçirgenlik testi sonuçları.	111
4.10. Göz içi Basıncı (mmHg) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.	118
4.11. DRP için F1 LD F1 tasarımı.	124
4.12. DRP verisinden elde edilen göreceli etkiler.	124
4.13. DRP değerleri için farklı grup ve zaman noktalarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları.	125

- 4.14.** Çalışma gruplarında yeralan tavşanların çalışma süresince 1., 2., 3. ve 4. Ölçüm zamanlarında OKT ile ölçülen retina kalınlıklarının (μ), ortalama standart sapma, standart hata ve medyan değerleri. 128
- 4.15.** Grupların, 3. ve 4. ölçüm zamanlarındaki retina kalınlık ölçümlerinin, 2. ölçüm zamanındaki retina kalınlık ölçümleri ile karşılaştırmaları için p değerleri. 129
- 4.16.** FFA için F1 LD F1 tasarımı. 130
- 4.17.** FFA verisinden elde edilen göreceli etkiler. 131
- 4.18.** FFA değerleri için farklı grup ve zaman noktalarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları. 132
- 4.19.** FFFM değerlerine ilişkin istatistiksel analiz sonuçları. 134

1. GİRİŞ

Diyabetik Retinopati (DRP), Diyabetes Mellitusa bağı olarak gözün retina tabakasında gelişen tüm yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin oluşturduğu klinik tablodur. Retina tabakası, görme için hayati öneme sahiptir dolayısıyla diyabete bağı olarak retina dokusunun harabiyete uğraması, görme düzeyinin azalması ve körlüğe sebep olur. Dünyada yaklaşık 4.2 milyon insan, DRP sebebiyle ağır görme kaybı yaşamaktadır (1).

DRP'te görme kaybı diyabetik maküler ödem (DMÖ) ve Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR) olmak üzere iki farklı tabloya bağı gelişir. Son yıllarda DMÖ'ye bağı görme kayıplarının oranı artmıştır. DRP'ye bağı körlüklerin önlenmesinde en önemli strateji DRP bulgularının etkin tedavisidir. DRP tedavisinde 2012 yılından itibaren endikasyonlu tedavi seçenekleri kullanılmaktadır (2, 3). 2012 yılından itibaren kullanılan intravitreal uygulamalar hem anatomik hem de görme düzeylerinde anlamlı oranda iyileşme sağlamaktadır ancak bu uygulamaların tedaviye cevapsızlık, etkin maddeye ve uygulama yoluna bağı ciddi yan etki gelişme riski gibi önemli kısıtlılıkları da mevcuttur (4, 5). Bu kısıtlılıklar, intravitreal tedavilerin klinik pratikte hedeflenen düzeyde uygulanamamasına sebep olmaktadır.

Retina hastalıklarının tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biri gözün kendine has anatomik ve fizyolojik bariyerleri sebebiyle arka segmente etkin bir şekilde ilaç ulaştırılmamasıdır (6, 7). Gözün arka segmenti, tüm vücutta ilaç uygulama, uygulanan ilaç düzeyinin terapötik doza ulaşmasını sağlama ve bunu istenen süre koruyabilme açısından en zor bölgelerden biridir (8-11). DRP gibi arka segment hastalıklarının tedavisinde vitreusta etkin dozun sağlanması için en etkin uygulama yolu intravitreal enjeksiyonlardır (11, 12). Ancak intravitreal enjeksiyonla ilaç molekülleri göze herhangi bir taşıyıcı olmaksızın uygulandığında vitreustan hızla uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle istenen intravitreal ilaç konsantrasyonunun sağlanması için tekrarlayan intravitreal enjeksiyonlar gerekli olmaktadır. Tekrarlanan intravitreal uygulamalar hem maliyeti hem de retina dekolmanı ve endoftalmi gibi ciddi komplikasyonların gelişim riskini arttırmaktadır (5).

DRP uzun süreli tedavi gerektiren kronik bir hastalıktır. Bu sebeple tekrarlayan intravitreal enjeksiyonlara bağlı gelişebilecek komplikasyonların önlenmesi için vitreusta ilaç kalım süresini uzatacak toksik olmayan, biyouyumlu yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır. Son on yılda, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin arka segmente ilaç taşınımı ve diğer pek çok biyomedikal alanda kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır (13-16). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddelerin çözünürlük problemlerinin çözülmesinde, vücuttaki bariyerlerin aşılmasında, kontrollü salım sağlanmasında etkili çözümler getirmektedir (9, 17, 18). İntravitreal nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, etkinliği yüksek ama çözünürlüğü ve yarılanma ömrü düşük ilaçların uygulanmasına fırsat verme, kontrollü salım sağlayarak intravitreal enjeksiyon sıklığını azaltma ve retina dokusuna geçişi artırarak tedavi cevabını artırma gibi üstünlükler sağlamaktadır (10,19, 20).

Maküler ödem diyabet başta olmak üzere pek çok hastalığa bağlı olarak maküla bölgesinde, retina tabakaları arasında sıvı birikimi olarak tanımlanır. Asetazolamid (ACZ) diyabete ve pek çok diğer hastalığa bağlı olarak gelişen maküler ödemin tedavisinde uzun yıllardır *endikasyon dışı* olarak kullanılan bir etkin maddedir (21-24). ACZ'nin çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının düşük olması sistemik uygulamalarını zorunlu kılmaktadır. Ancak uzun süreli sistemik ACZ kullanımına bağlı olarak gelişen yan etkiler bu uygulamaların kısa süreyle yapılabilmesine imkân vermektedir (23,25). Bu nedenlerle ACZ, göz hastalıklarının tedavisinde sadece ameliyat öncesi veya acil durumlarda, kısa süreli olarak oral yolla uygulanmaktadır. ACZ'nin plazma yarılanma ömrünün çok kısa olması sebebiyle, hemen salım formunun intravitreal uygulaması da vitreusta etkin dozun anlamlı bir süre sağlanabilmesi açısından umut verici görünmemektedir. Bu nedenlerle ACZ diyabetik retinopati tedavisi için yüksek etkinliğe sahip olmasına rağmen düşük biyoyararlanımı sebebiyle kullanımı kısıtlıdır.

Tez çalışmaları kapsamında; DRP tedavisinde kullanılmak üzere intravitreal yolla uygulanacak ACZ yüklü siklodekstrin (CD) nanopartikül (ACZ-CD-NP) formülasyonu geliştirilmiş, salım ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen ve karakterize edilen ACZ-CD-NP'lerin, DRP tedavisindeki *in vitro* ve *in vivo* etkinliği ve toksisitesi incelenmiştir.

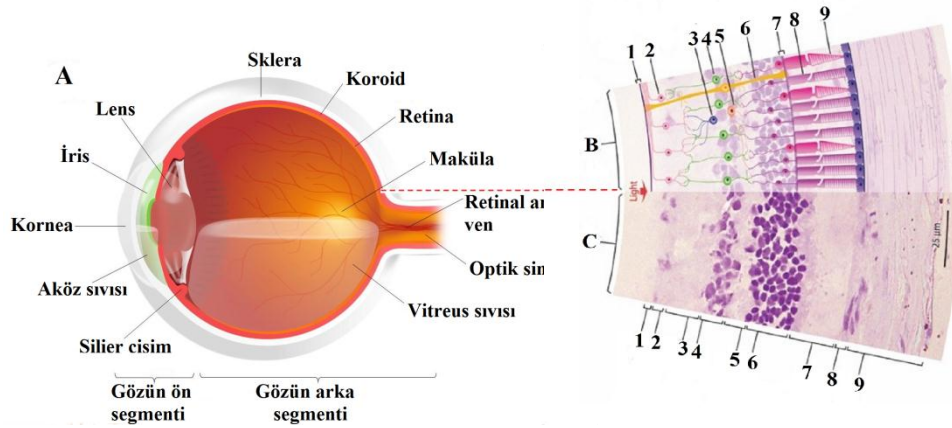
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Göz ve Görme

Görme, cisimlerden yansyarak göze ulaşan ışığın, anlamlı bir görüntü haline dönüşmesi işlemidir. Göz, cisimlerden yansyan ışığı işleyerek elektriksel uyarılara çeviren ve optik sinir aracılığı ile beyne ileten duyu organıdır.

2.2. Göz Anatomisi

Göz, ön segment ve arka segment olmak üzere iki ana kısma ayrılır (Şekil 2.1.). Ön segment; kornea, ön kamara, iris, pupilla, lens ve silier cisimden oluşur. Arka segment; vitreus, retina ve koroidden oluşur. Kornea, gözün 1/6'lık ön yüzünü oluşturan şeffaf, sert damarsız yapıdır. Gözün kırma kuvvetinin üçte ikisine sahiptir.



Şekil 2.1. Gözün anatomik ve histolojik yapısı: A) Göz dokularının anatomik yapısı (16), B) Retina dokusunda yer alan hücre gruplarının şematik gösterimi, C) Retina tabakalarının histolojik görünümü (26) B.1: İç limitan membran 2: Gangliyon Hücresi 3: Amakrin Hücresi 4: Bipolar Hücre 5: Horizontal Hücre 6: Müller Hücresi 7: Dış Limitan Membran 8: Basil 9: Koni C.1: Retina Sinir Lifi Tabakası 2: Gangliyon Hücre Tabakası 3: İç Pleksiform Tabaka 4: İç Nükleer Tabaka 5: Dış Pleksiform Tabaka 6: Dış Nükleer Tabaka 7: Basil ve Koni Tabakası 8: Retina Pigment Epiteli 9: Koroid.

Aköz sıvısı, ön kamarayı dolduran, göz içi basıncını dengeleyen ve besin sağlayan şeffaf sıvıdır. İris, gözün renkli kısmını oluşturan yapıdır. İrisin merkezindeki dairesel açıklık pupilla olarak adlandırılır. İris göze ulaşan ışığın miktarına göre kasılıp gevşeyerek, pupillanın büyüklüğünü ve göze giren ışık miktarını ayarlar. Lens göze gelen ışığın retinaya odaklanması için hassas ayarlamaları sağlayan bikonveks şekilli

şeffaf bir yapıdır. Bir hamak gibi, ince zonüller tarafından siliyer kasa asılı durur (Şekil 2.1.) (27, 28).

Vitreus sıvısı, göz küresini dolduran, renksiz, şeffaf, damarsız, jelimsi maddedir. Yaklaşık 4 mL'lik bir hacme sahiptir. Vitreusun %99'u su, %1'lik kısmı hiyaloronik asit ve farklı tiplerde kollajenden oluşur (27-29) (Şekil 2.1.).

2.2.1. Retina

Retina, gözün arka duvarının en iç kısmında yer alan, görünür ışığı elektrokimyasal uyarılara dönüştüren saydam nöral dokudur. Bu elektrokimyasal uyarılar beyne iletilir ve burada görme olarak işlenir. Retina nöral, glial ve vasküler elemanlardan oluşan çok tabakalı özelleşmiş bir dokudur (27-29). Retina histolojik olarak iki kısma ayrılır:

- **Nörosensoryel Retina**

Nörosensoryel retina, özelleşmiş farklı hücre tabakalarından oluşan bir dokudur. İç limitan membran ile dış limitan membran arasında yer alır.

İç limitan membran (ILM), retinanın iç yüzeyinde Müller hücrelerinin basal membranı tarafından oluşturulur ve tüm retina yüzeyini örter. **Sinir lifi tabakası**, gangliyon hücrelerinin aksonlarından oluşur. Kalınlığı bölgesel olarak farklılıklar göstermektedir. Optik sinir çevresinde en kalın, periferik retinada ise en incedir. **Gangliyon hücre tabakası**, gangliyon hücrelerinden oluşmaktadır. Bu tabakada gangliyon hücrelerinin sadece gövdeleri bulunmaktadır, aksonları ise sinir lifi tabakasında yer alır. Gangliyon hücreleri, görsel iletim yolağında yer alan ikinci derece nöronlardır, fotoreseptörlerden aldıkları uyarıyı, uzun aksonları ile talamusa iletirler. **İç pleksiform tabaka**, bipolar hücreler ile amakrin hücrelerin sinaps yaptığı bölgedir. Bu sinapslar ile nöronal sinyal gangliyon hücrelerine iletilmektedir. Bu etkileşimler retinal görüntünün ayarlanmasında görevlidir. **İç nükleer tabaka**, bipolar hücrelerin gövde ve nükleusları ile horizontal ve amakrin hücrelerin nükleuslarını içermektedir. Bipolar hücreler, fotoreseptörlerden gelen elektrik uyarılarının gangliyon

hücrelerine aktarılmadan önce işlendiği birinci nöron hücreleridir. **Dış pleksiform tabaka**, rod ve koni hücre aksonları ile bipolar hücrelerin dendritleri ile sinaps yaptığı tabakadır. Horizontal ve bipolar hücrelerin lifleride bu tabakada bulunmaktadır. Ayrıca ortam ışığının çok yoğun olduğu durumlarda görme fonksiyonunun düzenlenmesine katkı sağlayan internöron hücrelerin çekirdekleri de bu tabakada yer alır. **Dış nükleer tabaka** (Fotoreseptör tabakası), rod ve koni hücrelerinin çekirdeklerinin bulunduğu tabakadır. Tüm retinada yaklaşık 7 milyon koni hücresi, 130 milyon rod hücresi vardır. Fotoreseptörlerin retina dokusundaki dağılımı ve yoğunlukları, retinanın topografik özelliklerine göre değişir. Koniler keskin görme renkli görmeden sorumludur. En yoğun olarak buldukları alan maküladır ve perifer retinaya doğru azalır. Rodlar loş ışıktaki görmeden sorumludur, makülanın 350 µm çaplı merkezi bölümünde hiç rod hücresi bulunmaz. **Dış limitan membran (DLM)** birbirine komşu fotoreseptör ile Müller hücrelerinin bağlantı bölgelerinden oluşur ve gerçek bir membran değildir (27-29) (Şekil 2.1.).

- **Retina Pigment Epiteli (RPE)**

Nöral retina ile koroid arasında bulunan, küboid yapıda sitoplazmasında çok miktarda melanin pigmenti içeren hegzagonal hücrelerden oluşmaktadır. Melanin, retinaya ulaşan ışığın absorbe edilmesini sağlar. Retina Pigment Epiteli çok fonksiyonlu bir tabakadır, hücrenin apikal kısmı fotoreseptörlerle yakın bağlantı içindeyken, basal kısmı *bruch* membranına yapışıktır. RPE tabakasının, retinanın fonksiyonlarının devamında, koryokapillaris ile retina arasındaki madde geçişinin kontrolü, retinol metabolizmasının düzenlenmesi ve subretinal alandaki sıvının koryokapillaris pompalanması gibi çok önemli görevleri vardır (30-34).

- **Subretinal Alan**

RPE ile sensöriyel retina arasındaki potansiyel boşluk subretinal alan olarak adlandırılmaktadır. Bu alanda fotoreseptörlerle RPE arasında, RPE'nin mikrovillusları uzanmakla birlikte aralarında anatomik bir bağlantı mevcut değildir (27-29).

- **Koroid**

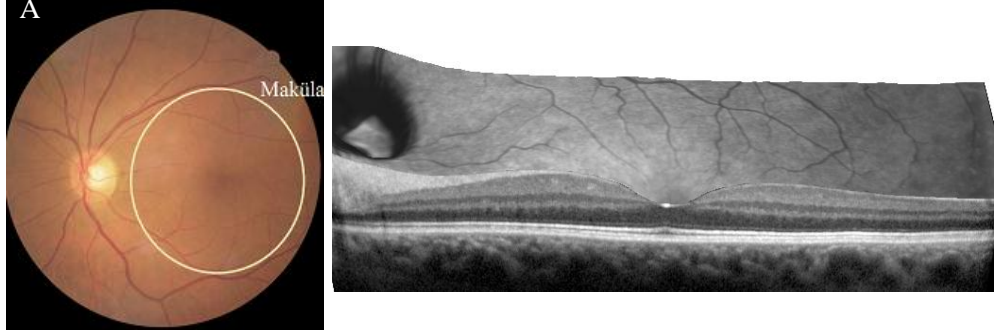
RPE'nin altında yer alan, 3 kat damar tabakasının oluşturduğu, yaklaşık 0,25 mm kalınlığındaki vasküler tabakadır. Retinanın avasküler 1/3'lük dış kısmı koroid tarafından difüzyon yoluyla beslenir (27-29).

- **Müller Hücreleri**

Müller hücreleri, iç limitan membrandan dış limitan membrana kadar, nöral retinanın tüm katları boyunca uzanan glial hücrelerdir (Şekil 2.1.). Hem nöral hücreler hem de damar hücreleri ile bağlantıları vardır (35). Bu yapısal özelliği sebebiyle retina hücrelerinin vitreus, retinal damarlar ve subretinal alan gibi pek çok farklı kompartmanla bağlantısını sağlarlar (35, 36). Yapılarında iyonik kanallar, transmembran proteinler ve pek çok enzim vardır. Müller hücreleri sağlıklı retinada kan akımının düzenlenmesi, retina dokusundaki elektrolit dengesinin sağlanması, sıvı homeostazının sağlanarak pH düzenlenmesi gibi çok önemli görevler üstlenir (37-39).

2.2.2. Maküla

Maküla retinanın merkezinde optik disk temporalinde, alt ve üst temporal vasküler arkadlar arasında yer alan, keskin görmeyi sağlayan yaklaşık 4,5-6 mm çapında özelleşmiş retina bölgesidir (Şekil 2.2.). İçeriğinde bulunan ksantofile bağlı olarak fundus muayenesinde sarı renkte görünür ve sarı nokta olarak da adlandırılır. İki veya daha fazla sıra gangliyon hücre tabakası bulunması ve sinir lifi tabakası içermemesi ile retinanın diğer bölgelerinden histolojik olarak farklıdır. Fovea, maküla merkezindeki yaklaşık 1,5 mm çaplı bölgedir ve özellikle renkli görme ve keskin görmeye yönelik bir yapıya sahiptir (27-29).



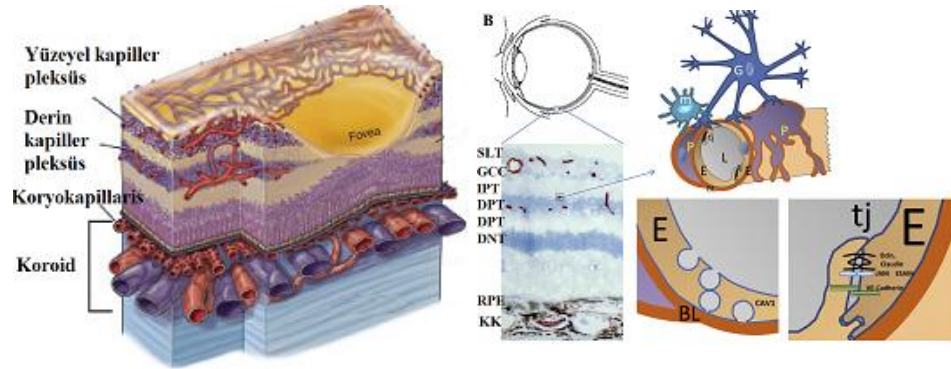
Şekil 2.2. Sağlıklı bir kişinin makülasının renkli fundus fotoğrafı (RFF) (A) ve üç boyutlu Optik Koherens Tomografi (OKT) görüntüsü (B) (40).

2.2.3. Retinanın Dolaşım Sistemi

Vücutta yüksek nöronal aktiviteye sahip olan retina ve beyin gibi dokular, diğer vücut dokularına göre daha fazla oksijen ve besin desteğine ihtiyaç duyarlar. Bu ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için bu dokular vücudun basal metabolik kaynaklarından, diğer dokulara göre daha yüksek oranda pay alırlar (41). Beyin, vücudun tüm basal metabolik kaynaklarınının %20'sini, retina ise %8'ini kullanır (42, 43). Sistemik dolaşımdan bu kadar yüksek oranda destek sağlanabilmesi, bu dokuların kendilerine has bazı özellikleri sayesinde mümkün olabilmektedir (44, 45). Retina dokusunun kendine has iki önemli özelliği diğer dokulardan farklı bir kanlanma sistemine sahip olması ve yapısında bulunan Kan Retina Bariyer (KRB) sistemleridir (Şekil 2.3.) (44). Karmaşık bir dual vasküler sistem tarafından oluşturulan güçlü retinal kanlanma sistemi, nöronal aktivitenin devamı için gerekli olan yüksek düzeyde oksijen ve besin desteğini sağlar (46). KRB'leride, sistemik dolaşımdan retina dokusuna gelen kanı çok sıkı bir filtrasyona tabi tutarak, sadece yüksek metabolik ihtiyaca cevap verebilecek moleküllerin geçişine izin verirler (47, 48). Bu sayede çok yüksek hassasiyete sahip nöral hücrelerin oluşturduğu retina dokusunun, ihtiyaç duyduğu besin ve oksijen desteği sağlanırken aynı zamanda sistemik dolaşımdaki antijen, toksin ve diğer yabancı moleküllere maruziyeti de önlenmiş olur (34, 49).

Retina tabakaları birbirinden bağımsız iki farklı vasküler sistem tarafından beslenir: Avasküler yapıda olan dış retina tabakasında yer alan fotoreseptör hücreleri, koryokapillaristen beslenirken, iç retina tabakaları, santral retinal arterden köken alan

yüzeysel ve derin retinal pleksüsler tarafından beslenir (Şekil 2.3.). Bu iki vasküler sistemin embriyolojik kökenleri, özellikleri ve fonksiyonları birbirinden tamamen farklıdır (46).



Şekil 2.3. Oküler dolaşımın anatomisi ve KRB'nin yapısı: A) Retina ve koroid damarlarının şematik gösterimi (46) B) İç KRB'nin şematik gösterimi (47). Üst Panel: KRB, retinal kapiller endotel hücreleri tarafından oluşturulur. Retina kapiller endotel hücreleri, perisitler ve glial hücrelerin ayaklı çıkıntıları tarafından oluşturulur. Sol panel insan retina kesitinin claudin 5 proteinlerine yönelik boyanmasını (kırmızı) gösteren kesitini göstermektedir. Alt paneller: Moleküllerin geçişini kontrol eden paraselüler ve transselüler yol. Paraselüler yol sıkı bağlantı noktaları (tj), okludin (Ocln), kavşak bağlantı molekülleri (JAM), endotel hücrelerine özel bağlantı molekülleri (ESAM) tarafından oluşturulurken, gevşek bağlantılar, VE Cadherin, caveolin-1(CAV1) tarafından oluşturulur. BL: Basal lamina, CC: Koryokapillaris, E: endotel hücresi, G: makroglial hücre (Müller hücresi veya astrosit), GHT: Gangliyon Hücre Tabakası, INT: İç nükleer tabaka, IPT: İç pleksiform tabaka, L: Lümen, m: microglia, DNT: Dış nükleer tabaka, DPT: Dış Pleksiform tabaka, P: Perisit, RPE: Retina pigment epiteli.

Bu iki sistemik dolaşımın retina dokusuna geçişinde iki önemli kan retina bariyeri yer alır:

İç kan retina bariyeri (iKRB): Retinal kapillerler ve retina dokusu arasındaki su ve molekül taşınımını kontrol eden bariyerdir (44, 45, 47). Retinal damarların vasküler endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar tarafından oluşturulur (Şekil 2.3.). Damar duvarında yer alan perisitler ile endotel ve perisit hücrelerinin ortak bazal membranı da iKRB'nin yapısına katkıda bulunur. Müller hücreleri, astrositler ve mikroglialar da damar duvarını sararak iKRB'nin yapısına destek verir. KRB'leri mutlak sızdırmaz bir bariyer değildir. Sistemik dolaşımdan gelen kan bileşenlerini sıkı bir filtrasyona tabii tutarak sadece göz dokularına gerekli olan maddelerin geçişine izin

veren, diğer maddelerin geçişini engelleyen yüksek seçicilikte geçirgen özelliktedir (30, 46, 47, 49). KRB'nde sistemik dolaşımdan gelen maddelerin retinaya taşınması iki yolla olur:

Paraselüler yol, suda çözünen ve küçük moleküllerin geçişine izin veren iletim yoludur (50). Hücrelerarası sıkı bağlantılar (*tight junctions*), kavşak bağlantıları (*adherent junctions*) ve geçiş bağlantıları (*gap junctions*) olmak üzere farklı bağlantı tiplerinden oluşur. Bu üç farklı bağlantı tipinde de pek çok farklı protein görev almaktadır (51-54). Hücrelerarası sıkı bağlantıların yapısını çoğunlukla, occludin, claudin-1, claudin-2 and claudin-5 bağlantı kavşak proteini A ve C oluşturur (47, 51, 55-57). Kavşak bağlantıları (*adherent junctions*); VE-Cadherin and N-Cadherin/Angiomotin-like protein 1 (AmotL1) β -Catenin proteinleri tarafından oluşturulurken, gap bağlantıları; konneksonlar (cx) tarafından oluşturulur (51-54).

Transsellüler yol, retina damar endoteli boyunca maddelerin transitozis yoluyla taşınmasıdır (58). Retina ve koroidal dolaşımda transsellüler yolda görev alan en önemli protein caveolin-1(CAV-1)'dir (59). Transsellüler yolla madde taşınması, pek çok farklı mekanizma ile gerçekleştirilir (47). KRB'inde transsellüler yolla taşınım genellikle retinadan sistemik dolaşıma su ve molekül iletiminde kullanılır, en etkin mekanizma *efflux* taşıyıcılarıdır (44). KRB'inde yer alan *efflux* taşıyıcılarının en bilinenleri, P-glikoprotein (P-GP/ABCB1), Meme Kanseri Resistans Proteinini (BCRP/ABCG2) ve çoklu ilaca direnç proteini (Multidrug Resistance-Associated Protein, MRPs/ABCCs). Küçük lipofilik moleküller, retinal endotel hücresi boyunca pasif difüzyonla geçerken (60), daha büyük lipofilik ve hidrofilik moleküller, ATP-bağımlı reseptör aracılı vesiküler transport, reseptör aracılı olmayan pinositoz, transporter'lar ve pompalar gibi başka yollarla geçebilirler. KRB'inde transsellüler yolla taşınım genellikle retinadan sistemik dolaşıma su ve molekül iletiminde kullanılır, en etkin mekanizma *efflux* taşıyıcılarıdır (44).

Farklı tipteki bağlantılar birbiri ile hem yapısal hem de fonksiyonel olarak ilişkilidir (61).

Dış kan retin bariyeri) (dKRB) RPE hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin oluşturduğu, koryokapillaris ile subretinal alan ve RPE hücreleri arasındaki su ve molekül taşınımını kontrol eden bariyerdir (30). Müller hücreleri ile fotoreseptörler arasındaki sıkı bağlantı kompleksi-benzeri bağlantıların oluşturduğu dış limitan membran da dKRB'inin yapısına katkıda bulunur (62).

KRB'leri, sistemik dolaşımdan retinaya su ve molekül taşınımını düzenleyerek, makromoleküllerin ve retinaya zarar verme potansiyeli olan maddelerin retina dokusuna sızmasını engelleyerek retina dokusunu korurlar. Kan retina bariyerleri sayesinde göz, immünolojik olarak farklı ve özgün özelliklere sahip olduğundan vücudun immün imtiyazlı (immün *privilage*) alanı olarak tanımlanır (63). KRB'leri nedeni ile sistemik ilaç uygulamalarının retinaya geçişi sınırlı ve biyoyararlanımı düşüktür.

2.2.4. Görme

Göze gelen ışınlar gözün ön segmentinde yer alan kırıcı ortamlar (kornea ve lens) tarafından kırılarak retinaya odaklanır. Retinada görme noktasında odaklanan ışık ışınları, retina hücreleri tarafından işlenerek elektriksel uyarıya dönüştürülür. Bu elektriksel uyarı beynin bir uzantısı olan görme siniri tarafından beynin görme ile ilgili alanlarına iletilir. Görme göz ve beynin birlikte gerçekleştirdiği bir işlemdir. Pek çok akut ve kronik hastalık, ön segment ve arka segmentte yer alan yapıları etkileyerek görme kaybına sebep olur. Dünyada halen ön segment ve arka segment hastalıklarına bağlı olarak 4,4 milyon görme kaybı yaşayan kişi vardır. Bu sayının 2050 yılında 10 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir (64). Görme kayıplarının % 60'ı, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), DRP, ven dal tıkanıklığı ve üveitler gibi arka segment hastalıklarına bağlı gelişir (65). Ağır ve ciddi görme kaybı yapan önemli bir arka segment hastalığı olan DRP dünyada 93 milyon kişiyi etkilemektedir ve bunların 28 milyonunda görmeyi tehdit edici düzeyde ağır bulguları vardır (1).

2.3. Diyabetik Retinopati

Diyabetik Retinopati (DRP), Diabetes Mellitus'a bağlı olarak gözün retina tabakasında gelişen tüm yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin oluşturduğu klinik tablodur. Diabetes Mellitus (DM); insülin sekresyonu ve/veya etkisindeki eksikliklerden kaynaklanan, kronik hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarındaki bozuklukla birlikte seyreden kronik, metabolik bir hastalıktır. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle Tip 2 diyabet sıklığı hızla artmaktadır (66). Günümüzde diyabet hem sıklığındaki artış hem de sebep olduğu komplikasyonlar ve tedavi masrafları sebebiyle çok önemli bir sağlık sorunudur (67). 2016 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayımlanan verilere göre dünyada yaklaşık 422 milyon DM tanılı hasta bulunurken bu sayının 2030 yılında 750 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (68). Ülkemizde 1997-1998 yıllarında yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji (TURDEP-I) çalışması verilerine göre Tip 2 diyabet sıklığı %7,2 olarak saptanmışken, 2010 yılında yapılan TURDEP-II çalışmasında ise %13,7'ye ulaştığı görülmüştür (69). Diyabetin seyrine bağlı olarak pek çok ağır makrovasküler ve mikrovasküler kronik komplikasyon gelişebilir. En sık görülen makrovasküler komplikasyonlar kardiyovasküler hastalık, serebrovasküler olay ve periferik arter hastalığı olurken, en sık görülen mikrovasküler komplikasyonlar ise retinopati, nefropati, periferik ve otonom nöropatidir (70).

Diyabete bağlı olarak gözün retina tabakasında yapısal ve fonksiyonel harabiyet gelişmesi DRP olarak adlandırılır. Retina tabakası, görme için hayati öneme sahiptir dolayısıyla diyabete bağlı olarak retina dokusunun harabiyete uğraması, görme düzeyinin azalması ve körlüğe sebep olur. DRP diyabetin en sık görülen mikrovasküler komplikasyonu olup dünyada 20-74 yaş arasındaki körlüklerin en önemli sebebidir (71). Yapılan çalışmalar diyabet tanısı alan hastaların yaklaşık %35'inde DRP geliştiğini ve buna bağlı olarak da tüm diyabetiklerin %10'unda DRP'ye bağlı olarak ağır düzeyde görme kaybı geliştiğini göstermektedir (72). Dünyada yaklaşık 4,2 milyon insan, DRP sebebiyle ağır görme kaybı yaşamaktadır (1).

2.3.1. Diyabetik Retinopati Etiyopatogenezi

DRP patogenezinde ana mekanizma retinal hücreler üzerine kronik hipergliseminin doğrudan etkisidir. DRP retinanın perikapiller arteriollerini, kapillerlerini ve venüllerini etkileyen mikrovasküler oklüzyon ve kapiller hasar perisit kaybı, kapiller bazal membran kalınlaşması, vasküler düz kas hücrelerinin kaybı ve endotelial hücre proliferasyonuna bağlı gelişen vasküler permeabilite artışı ile karakterize bir mikroanjiopatidir. Vasküler permeabilite artışı lokal/yaygın ödeme, mikrovasküler oklüzyon ise retinal iskekiye, daha ileri dönemde yeni damar oluşumlarına yol açar. Bu bulguların yaygınlığı ve şiddeti ise DRP'nin evresini belirler. DRP gelişiminde non-enzimatik glikolizasyon, sorbitol polyol yolu , oksidatif stres, protein kinaz C ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi pek çok farklı metabolik yolak etkin role sahiptir (73). Diyabetin vasküler geçirgenlik artışı ve anjiyogeneze yol açan yapısal ve fonksiyonel değişikliğin, pek çok farklı mekanizma tarafından tetiklendiği gösterilmiştir (67). Bu mekanizmalardan bazıları şöyle özetlenebilir:

a) Sitokin ve Büyüme Faktörü Salımının Artması

KRB harabiyeti, lokal sitokin salımında artışa sebep olur. DRP seyrinde göz içindeki proanjiojenik ve antianjiojenik faktörlerin dengesi bozulur, proanjiojenik faktörlerin düzeyleri anlamlı olarak artar. Göz içinde, VEGF, Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), anjiopoetin-2 (Ang-2), osteopontin (OPN) ve Eritropoetin (EPO) gibi proanjiojenik faktörlerin düzeylerinde anlamlı bir yükselme olurken, PEDF (Pigment Epitel Kaynaklı Büyüme Faktörü), endostatin (ES), anjiostatin (AS) gibi antianjiojenik faktörlerin düzeylerinde de azalma izlenir. Diyabetik retinopati gibi anjiyogenez ve artmış vasküler geçirgenliğin izlendiği tüm oküler hastalıklarda en önemli anjiojenik mediyatör VEGF'dür (74).

• Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

VEGF, Retina pigment epitel hücreleri, Müller hücreleri, endotel hücreleri, perisit hücreleri, ganglion hücreleri gibi pek çok farklı hücre tarafından sentezlenen 45

kDa ağırlığında heparin-bağlayıcı homodimerik bir glikoproteindir. Altı alt gruptan oluşur (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasental büyüme faktörü) (75). VEGF, 1983 yılında Senger tarafından tanımlanmıştır ve başlangıçta geçirgenlik artışı üzerindeki güçlü etkileri sebebiyle 'vasküler permeabilite faktörü' olarak isimlendirilmiştir (76, 77). Diyabetik bireylerde, göz dokularında VEGF düzeylerinde anlamlı olarak artış mevcuttur (78). Diyabete bağlı retina dokusunda gelişen vasküler geçirgenlik artışı ve anjiogenesis sürecinde VEGF çok önemli role sahiptir (74).

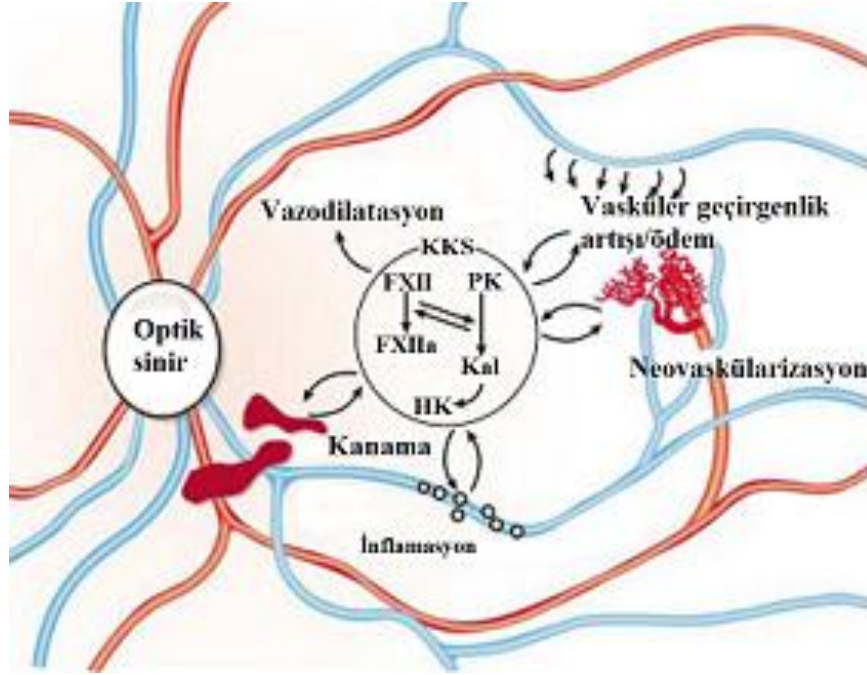
Hayvan deneyleri ve klinik araştırmalar, diyabetin neden olduğu retinal VEGF seviyelerindeki artışın, KRB harabiyeti ile eşzamanlı geliştiğini göstermektedir (79). Diyabetik maküler ödem (DMÖ) hastalarının vitreuslarında, diğer hastalara göre yüksek oranda VEGF bulunur (78). İntravitreal olarak uygulanan VEGF, vasküler sızıntıyı güçlü bir şekilde arttırırken VEGF'ün blokajı, sızıntıyı önler ve maküler ödem tablosunu güçlü biçimde tersine çevirir (74). Bu nedenlerle VEGF'ün etkilerini inhibe eden anti-VEGF etkili ilaçlar, günümüzde DMÖ tedavisinde ilk seçenek ilaçlardır (4, 12).

b) İnflamasyon

Retinal inflamasyon, diyabetik retinopatinin patogenezinde çok önemli bir rol oynar (79, 80). Hiperglisemi, Tümör nekrozis Faktör- α (TNF- α), interlökin -1 β (IL-1 β) ve interlökin-6 (IL-6) gibi inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını uyardığı için proinflamatuvar bir durum olarak kabul edilmektedir. Bu kemokinler ve sitokinler retinal mikrovasküler yapıda, bağlantı proteinlerinin dağılım deseninin değişmesine, lökosit aktivasyonuna, interselüler adhezyon molekül-1 (ICAM-1) ve diğer hücrelerarası bağlantı moleküllerinin düzeyinin artışına sebep olurlar (81). Sonuçta, vasküler geçirgenlik artar, bu durum inflamatuvar sürecin daha da artmasını tetikler. Bu nedenlerden dolayı inflamasyonu baskılayan antiinflamatuvar ilaçlar DRP tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir (82-84).

c) Plazma Kallikrein Kinin Sistemi (KKS)

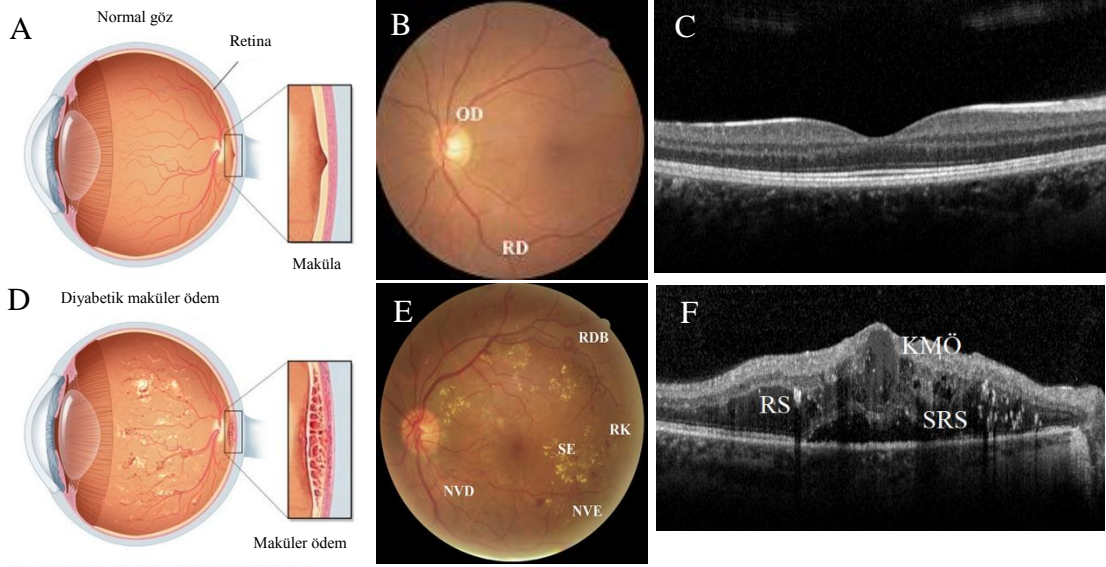
DMÖ patogenezinde üzerinde en çok çalışılan yollardan biridir (Şekil 2.4.) (84-86). KKS'inin, diyabetik maküler ödem gelişimi üzerindeki etkisi, diğer pek çok doku ve organda çok iyi tanımlanmış olan, vazojenik ödem üzerindeki etkileri ile uyumludur (87). KKS, farklı fizyolojik ve patolojik süreçlerde görev yapan çok fonksiyonlu ve kompleks bir endojen peptiderjik sistemdir. Plazma kallikrein, karaciğer tarafından proenzim prekallikrein olarak sentezlenen bir serin proteazdır. Prekallikrein, faktör XII tarafından aktive edilerek, kallikreine dönüştürülür. Kallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojeni (HMWK) bradikinine dönüştürür. KKS, retinada etkilerini primer olarak bradikinin aracılığıyla gerçekleştirir. Bununla birlikte, kompleman C3, trombin, plazmin ve endotelial NOS gibi pek çok diğer alternatif yolla da KKS aktivasyonunun retinal vasküler geçirgenlik artışından sorumlu tutulmaktadır (84,85). Buna ek olarak yeni çalışmalar KKS'inin VEGF'ün tetiklediği vasküler geçirgenlik artışında da rolü olduğunu göstermiştir (86). Sonuç olarak KKS, hem VEGF'den bağımsız hem de VEGF ile iletişimli yollarla retinal damarlarda geçirgenliğini artırır ve maküler ödem gelişiminde etkilidir (86, 88, 89). Plazma kallikrein inhibisyonu, DMÖ tedavisinde son yıllarda üzerinde yoğun olarak çalışılan bir hedef mekanizmadır. Plazma kallikrein inhibitör grubuna ait pek çok aday molekülün, DMÖ tanısına yönelik faz çalışmaları devam etmektedir (90).



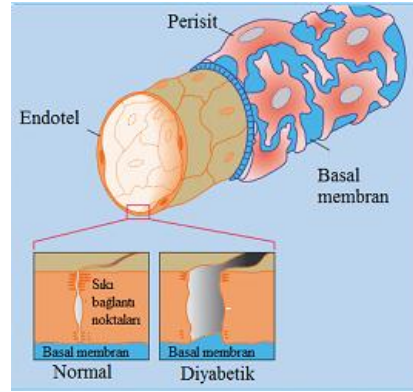
Şekil 2.4. KKS'nin vitreustaki diyabetik retinopati bulgularındaki potansiyel etkilerini gösteren şematik fundus resmi. Kırmızı çizgiler arterleri, mavi çizgiler venleri göstermektedir. FXII, faktör XII; HK, Yüksek molekül ağırlıklı kininogen; Kal, kallikrein; PK, prekallikrein; KKS, kallikrein-kinin sistemi (91).

2.3.2. Diyabetik Retinopatide Klinik Bulgular

Diyabetik retinopati seyrinde klinik bulgular anjiogenez ve vasküler geçirgenlik artışının sonucunda gelişir. Bu iki patolojik süreç DRP'nin iki farklı klinik tablosuna yol açar: Anjiogenez süreci mikrovasküler oklüzyon, hipoksi ve iskemiye bağlı olarak gelişir ve retina dokusunda yeni damar oluşumuna (retinal neovaskülarizasyon) yol açar. Bu tablo proliferatif DRP olarak tanımlanır. Vasküler geçirgenlik artışı ise KRB harabiyetine bağlı olarak gelişir ve makülada retina tabakaları arasında sıvı birikimine yol açar. Bu tablo da Diyabetik Maküler Ödem (DMÖ) olarak tanımlanır (Şekil.2.5.).



Şekil 2.5. Sağlıklı gözde ve PDR ve DMÖ tanısı olan gözde maküla ve retina dokularının gösterilmesi. A) Normal göz yapısının şematik gösterimi, B) Normal retina bulgularını gösteren RFF C) Normal maküla yapısını gösteren OKT görüntüsü D) Proliferatif DRP bulgularının ve maküler ödemin şematik gösterimi E) PDR bulgularını gösteren RFF F) Diyabetik maküler ödem bulgularını gösteren OKT görüntüsü (KMÖ: Kistoidmaküler ödem; NVD: Optik diskte neovaskularizasyon; NVE: Retinada neovaskularizasyon; OD: Optik disk; RD: Retinal damar; RDB: Retina damar duvarında bozukluklar; RK: Retinal kanamalar; SE: Sert ekzuda; SRS: Subretinal sıvı; RS: Retina içi Sıvı) (92,40).



Şekil 2.6. DRP'ye bağlı olarak retina damar geçirgenliğinde artışı (93).

PDR veya DMÖ, DRP seyrinde görme kaybına neden olan iki önemli klinik tablodur (95-97). PDR ve DMÖ'de klinik bulgular, takip ve tedavi ilkeleri birbirinden tamamen farklıdır. Bununla birlikte, anjiyogeneze ve vasküler geçirgenlik artışına yol açan hücresel mekanizmalar birbirine çok benzer ve birçok ortak basamağa

sahiptir. DRP hastalarının bir kısmında sadece PDR, bir kısmında sadece maküler ödem, bir kısmında ise her iki klinik tablo birlikte izlenmektedir (98, 99).

Erken tedavi çalışma grubu'nun (ETDRS) sınıflamasına göre DRP nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR) ve proliferatif diyabetik retinopati (PDR) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (78, 93). NPDR, erken evrelerde, artmış kapiller geçirgenlik ve mikrovasküler oklüzyona bağlı olarak gelişir ve mikroanevrizma, sert ekzuda, retinal kanamalar, *cotton-wool* spotlar, venöz değişiklikler ve intraretinal mikrovasküler anomali (IRMA) lezyonlarının izlendiği evredir (93).

- **Proliferatif Diyabetik Retinopati**

Diyabetin sebep olduğu hiperglisemik ortam, perisit ve endotel hücrelerinde harabiyete ve apoptozise yol açar (73, 93). Bu süreç, retina dinamiklerinin ve retinal damarlardaki otoregülasyonun bozulmasına sebep olur (78). Hipergliseminin devam etmesi DRP gelişiminde en önemli basamaklardan biri olan lökostazi uyarır. Ayrıca proteolitik enzimler ve sitokinler üreterek endotel hücre hasarına yol açarlar. Bu durumda retinal damar yapısı bozulur ve vazokonstriktör ve trombojenik özelliğe sahip sitokinler salgılanır. Bu sitokinler vazokonstriksiyonu ve damarlarda mikrotrombüslerin oluşmasına yol açarak damarlarda tıkanıklık oluşumunu uyarır. Vazokonstriksiyona uğrayan ve tıkanıklık gelişen retinal damarlar sebebiyle retina dokusunun beslenmesi bozulur (98). Küçük damarlarda gelişen tıkanıklık, retina dokularının beslenmesini engelleyerek hücrelerin oksijen ve besin desteğinden yoksun kalmasına ve iskemi gelişimine yol açar. İskemik kalan hücreler hipoksik faktörler salgılayarak iskemik sürecin pekişmesine sebep olur. Bu faktörlere cevap olarak vücut iskemi gelişen alanların beslenmesini sağlayabilmek için anormal yeni damar gelişimini uyarır. Gelişen bu yeni damarlar, düzensiz damar duvarına sahip, dilate ve kıvrımlı yapıdadır (Şekil 2.5.). Duvarların yapısı ince, hassas ve kırılındır. Beslenemeyen alanlara besin ve oksijen desteği sağlayamazlar ve DRP tablosunu ağırlaştırırlar. Hipoksik alanda kalan retina dokusunun beslenebilmesi için vücut tarafından üretilen neovaskülarizasyonun en önemli uyararı iskemidir (73, 78, 93, 98, 99).

Retina perfüzyonunun ilerleyici bozulmasına bağlı olarak optik disk yüzeyi ve retinada neovasküler dokuların gelişmesi sonucunda proliferatif DRP evresi gelişir. Bu yeni damarlar, olgunlaşmış ve duvarlarında az sayıda perisit içeren özellikle vasküler yapılar olmaları sebebiyle, sağlıklı vasküler yapılardan farklı olarak patolojik süreçlere karşı savunmasızdırlar. Optik disk neovaskülarizasyonu (NVD) veya retinanın başka herhangi bir yerinde bulunan neovaskülarizasyon (NVE), tedavi edilmezse, preretinal hemoraji, vitreus içi hemoraji (VH) ve fibröz doku proliferasyonuna sebep olabilir. Bu bulgular DRP'nin proliferatif evrede olduğunu gösterir (Şekil 2.5.).

- **Diyabetik Maküler Ödem**

Diyabetik maküler ödem, maküla bölgesinde, retina tabakaları arasında sıvı birikimi olarak tanımlanır. Retina dokusu içinde, hücreler arasındaki boşlukta biriken sıvı, kistler içinde birikerek 'kistoid maküler ödem' olarak adlandırılır (Şekil 2.5.) (99). Nörosensoriyel retina ile RPE arasında biriken sıvı, 'subretinal sıvı' olarak adlandırılır (Şekil 2.5.) (35).

Retina dokusunun, fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için hem yeterli hidrasyonun sağlanması hem de parenkimin dehidratasyonunun ve şeffaflığının korunması gereklidir. Bu dengeyi sağlamak için, sistemik dolaşımdan retina dokusuna geçen ve retina dokusundan sistemik dolaşıma geçen sıvı dengesi, kompleks bir mekanizma tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (34). Bu mekanizmada, dışarıdan gelen sıvının retina dokusuna geçişi kan retina bariyerleri tarafından kontrol edilirken, retina dokusunda biriken sıvının retina dokusundan uzaklaştırılması ise aktif drenaj sistemleri tarafından kontrol edilir (45, 100). Retinadaki bu sıvı trafiğini kontrol eden mekanizmalardan birinin veya her ikisinin de harabiyeti maküler ödem gelişimine sebep olur. Maküla, gözde keskin görmeden sorumlu olan merkezi retina bölgesidir. Makülada sıvı birikimi akut evrede foton iletimini bozarak görme kaybına sebep olur (Şekil 2.5.) (45-48). Maküler ödem tedavi edilmezse retina dokularında kalıcı harabiyete yol açarak görme kaybının daha ciddi ve geri dönüşümsüz evreye geçmesine yol açar (49, 68, 101).

- **Diyabetik Maküler Ödem Gelişim Mekanizmaları**

Maküler ödem KRB'deki harabiyet sonucunda gelişen artmış geçirgenliğin sebep olduğu sızıntıya veya retina dokusundaki sıvının sistemik dolaşıma iletiildiği uzaklaştırma mekanizmalarında meydana gelen harabiyete bağlı olarak gelişmektedir (34,45,47,102).

a) Kan Retina Bariyerlerinde Vasküler Geçirgenlik Artışı

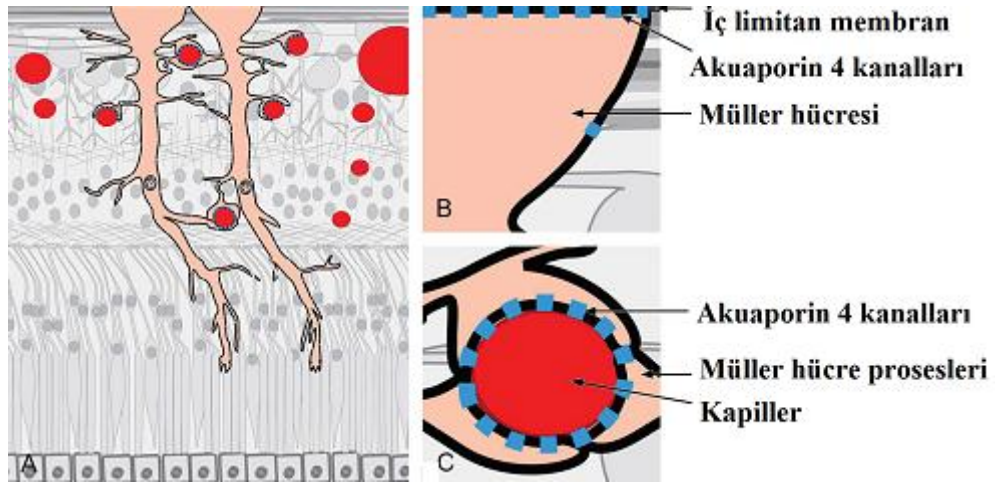
KRB harabiyeti, retinal damarın geçirgenliğinin artmasına, kan ve kan elemanlarının damardan retina dokusuna sızmasına sebep olur. Diyabet, endotelyal sıkı bağlantıların bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak paraselüler yoldaki hücrelerarası bağlantı komplekslerini oluşturan proteinlerin veya caveolin ve transselüler transportta görev yapan diğer taşıyıcı proteinlerin ifade düzeyinin, yapısının veya fonksiyonlarının değişmesine bağlı olarak KRB harabiyetine sebep olabilir (47, 48). Bunlara ek olarak diyabetin sebep olduğu, RPE, endotel ve perisit hücre kaybı da KRB harabiyetine katkıda bulunur (35). Bu değişiklikler sonucunda gelişen vasküler geçirgenlik artışı diyabetik maküler ödem gelişiminde çok önemli bir mekanizmadır (Şekil 2.6.) (34, 35, 45, 46, 103).

b) Retinal Sıvının Uzaklaştırılması Mekanizmalarında Harabiyet

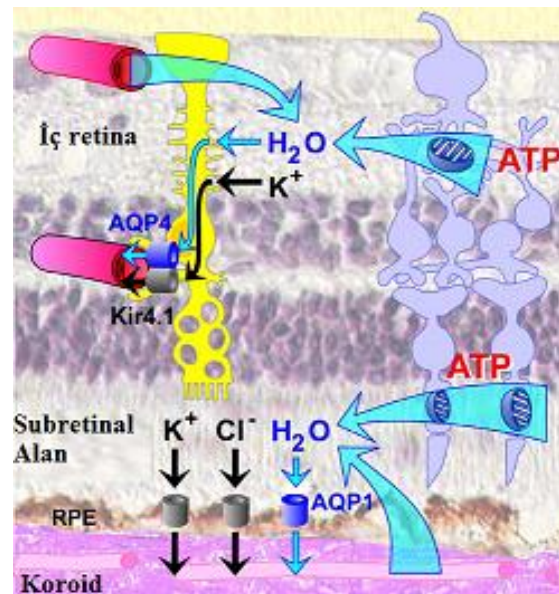
Normal fizyolojik koşullarda, subretinal boşlukta biriken sıvının sistemik dolaşıma iletilmesi RPE hücreleri tarafından, retina dokusunda biriken sıvının sistemik dolaşıma iletilmesi ise Müller hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Retinada biriken sıvının etkin bir şekilde uzaklaştırılması, hücrelerin yapısında bulunan su iletim kanalları ve enzimler sayesinde gerçekleşir. Retina dokusundan aktif sıvı drenajını sağlayan bu hücrelerin, retina dışına aktif sıvı iletiminde rol alan iki önemli yapı Aquaporinler (AQP), ve Karbonik Anhidraz (KA) enzimidir.

AQP, retina dokusunda ve subretinal boşlukta biriken sıvının Müller hücreleri ve RPE hücreleri tarafından sistemik dolaşıma boşaltılmasına aracılık eden yapılardır (104, 105). AQP, membranlar arasındaki osmotik gradyan ve hidrostatik basınç

farkına bağılı olarak, membranlardan iki yönlü su hareketini kolaylaştıran özel su kanallarıdır. RPE hücrelerinde AQP-1, Müller hücrelerinde AQP-4 bulunur (Şekil 2.7.) (37, 105). Retina parenkiminde biriken su, Müller hücreleri tarafından sistemik dolaşıma ve vitreusa pompalanır (Şekil 2.8.). Müller hücrelerinin uç bölgelerinde, çok yoğun AQP-4 kanalları bulunur. Bu kanallar Kir 4.1 ve Kir 2.1 K taşıyıcı kanalları ile birlikte çalışır (38). Hücrelerarası mesafede ışık uyarısı ile artan K ve retinal nöronlardan aktarılan su, bu kanallar aracılığı ile Müller hücrelerine, oradan da retinal damarlara ve vitreusa aktarılır. Her bir K molekülü ile birlikte yaklaşık 140 su molekülü retinada hücrelerarası mesafeden uzaklaştırılır (39).



Şekil 2.7. Müller hücre ayaksı uzantılarında AQP akanalları (A-C) (106).



Şekil 2.8. Retinada sıvı akışı (35).

Subretinal alanda biriken suyun koroid dolaşımına pompalanması ise RPE hücreleri tarafından sağlanır (35). Subretinal alandan koroide doğru RPE hücreleri tarafından sürekli bir iyon ve su pompalanması mevcuttur. Suyun koroide taşınması, RPE membranındaki AQP-1 kanalları aracılığı ile gerçekleştirilir (107). AQP'ler membranların sıvı geçirgenliklerini değiştirerek, yoğun ve hızlı bir sıvı değişim sürecine aracılık edebilir (108). Diyabete bağlı maküler ödem gelişiminde Müller hücrelerinde ve RPE'nin yapısında bulunan AQP'lerin harabiyetinin etkili olduğu gösterilmiştir (37, 38). Diyabetin sebep olduğu hiperglisemi, AQP-1, AQP-4 ve Kir 4.1 kanallarının yoğunluk ve dağılımında değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişim, retinadan vitreusa ve sistemik dolaşıma K ve H₂O taşınımını etkileyerek maküler ödem gelişimine sebep olur (35).

KA: Retinada hem RPE hücrelerinde hem de Müller hücrelerinde yoğun miktarda karbonik anhidraz enzimi vardır (109). RPE hücreleri, subretinal alanda biriken su ve iyonları sürekli koroid dolaşımına iletir. RPE, bu sıvı-elektrolit transferi sırasında, subretinal alandan 1.4 ile 11 $\mu\text{L}/\text{cm}^2/\text{sa}$ hızla sıvıyı koroide pompalar (110). RPE tarafından koroide doğru olan bu sıvı-iyon transportunu etkileyen en önemli faktörler hücrelerarası ortamın pH'sı ve HCO₃⁻ düzeyleridir. Hücrelerarası pH ve HCO₃⁻ düzeyleri, RPE hücrelerindeki KA enzimi tarafından kontrol edilir (110, 111). Bu sebeple, RPE hücrelerinin yapısındaki KA enzimi, subretinal alanın dehidratasyonunda çok önemli bir role sahiptir.

Müller hücrelerinde de, pH, CO₂ ve bikarbonat dengesinin sağlanması ve su taşınımının düzenlenmesinde önemli rolü olan çok miktarda aktif KA enzimi bulunur (37-39). Müller hücrelerinde mevcut olan bikarbonatla ilişkili taşıma mekanizmaları ve ayrıca K⁺ ve Na⁺ iyonlarının taşınmasında rol oynar veya bunları etkiler. Bu mekanizma retina sıvı dinamikleri üzerinde de etkilidir. Bu nedenlerle Müller hücrelerindeki KA'ların, retinal sıvı dinamiği ve maküler ödem gelişimi üzerinde etkili olduğu savunulmaktadır (106).

2.3.3.Diyabetik Retinopatide Görüntüleme Yöntemleri

Diyabetik retinopati tanı ve takibinde sıklıkla kullanılan görüntüleme yöntemleri renkli fundus fotoğrafı, fundus fluoresein anjiyografi, optik koherens tomografi, fundus fluorometri ve optik koherens tomografi anjiyografidir (27, 78, 96, 98).

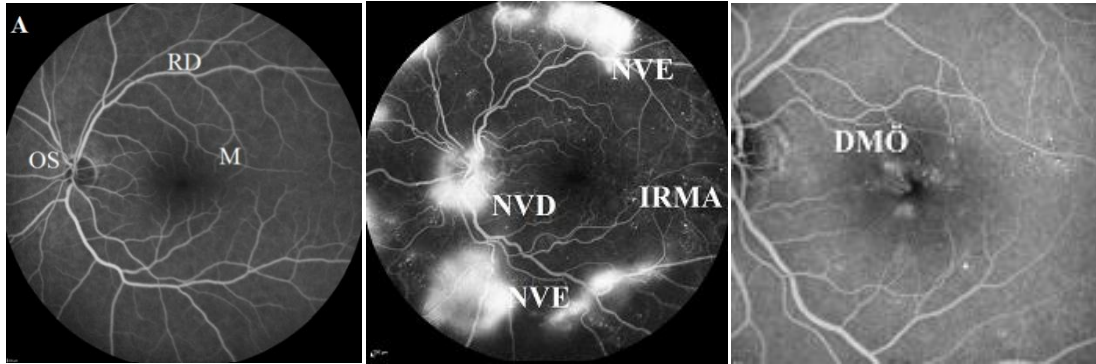
- **Renkli Fundus Fotoğrafı (RFF)**

Renkli fundus fotoğrafı (RFF), retina optik disk, maküla ve arka kutuptan oluşan gözün en iç yüzeyinin fotoğraflanması işlemidir (Şekil 2.5.) Renkli fundus fotoğrafı çekiminde görüntüler, stereoskopik veya nonstereoskopik kameralar kullanılarak alınır. Fundus kamera, bağlı bir kamera ile özelleştirilmiş düşük güçlü bir mikroskoptur. Optik tasarımı indirekt oftalmoskopa dayanmaktadır. Fundusa ait fotoğrafların elde edilmesi, incelenmesi ve karşılaştırılması retina hastalıklarının izlemi ve tedavisi açısından son derece önemlidir. Retina hastalıklarının ilk belirlenmesi fundus muayenesi ile ortaya konmaktadır. Bu nedenle renkli fundus fotoğrafı; hastalığın başlangıcı, takibi ve tedavisinde büyük önem arz etmektedir. Retina görüntülemelerindeki hızlı gelişmelere rağmen fundus kamera ve renkli fundus fotoğrafı halen kullanılmaya devam edilmektedir. Diyabetik retinopatinin günümüzde en sık kullanılan sınıflandırılmasında fundus görüntüsünün önemi yerini korumaktadır (27, 78, 96, 98). DRP ve DMÖ'nde santral ve periferik fundusa ait bulguların kayıt altına alınmasında hastalığın objektif kriterlere göre takip ve tedavisinde önemlidir.

- **Fundus Fluoresein Anjiyografi (FFA)**

Fundus fluoresein anjiyografi (FFA), fluoresein kontrast maddenin antekübital venden enjekte edildikten sonra vasküler yapılardan geçerken ışıkla aktive olup floresans yaymasıyla elde edilen fundus görüntüleme yöntemidir (27, 78, 96, 98). Tanımlanmasından günümüze kadar geçen 50 yılı aşkın bir süredir retinada vasküler sistemin değerlendirilmesinde altın standart olarak kullanılan görüntüleme yöntemidir (112). Fundus fluoresein anjiyografi retina damarlarının yapısı, bütünlüğü, sızıntının varlığı, anatomik lokalizasyonu ve vasküler perfüzyon dinamikleri hakkında çok

önemli bilgiler sağlar (27). Sodyum fluoresein intravenöz olarak verildiğinde %80'i plazma proteinlerine bağlanır ve %20'si plazmada serbest olarak dolaşır. Normal retina damarları fluoresein moleküllerinin ekstravasküler alana geçişine izin vermezken, anormal vasküler geçirgenlik olan alanlarda fluoresein damar dışına sızar (Şekil 2.9.). Diyabetik hastalarda diyabetik retinopatinin başlangıcıyla birlikte bozulan kan retina bariyerindeki patolojileri gösterebilmesi nedeniyle sık kullanılan bir retina görüntüleme yöntemidir (27, 78, 96, 98). FFA ile retinanın mikrovasküler sistemindeki bu değişiklikler oftalmoskopiye göre daha erken ve daha hassas olarak görüntülenebilmektedir (113). Özellikle retinanın perfüze olmayan alanları ve vasküler geçirgenliğin arttığı alanlar yalnız FFA ile saptanabilmektedir. Diyabetik hastalarda, retinopatinin tanı ve takibinde çok erken evrelerden itibaren çok değerli bilgiler veren bir yöntemdir (27, 78, 96, 98).



Şekil 2.9. Fundus fluoresein anjiografi görüntüleri A) Sağlıklı bir kişinin FFA incelemesi B) PDRP izlenen bir kişinin FFA incelemesi C) DMÖ izlenen bir kişinin FFA incelemesi (DMÖ: Diyabetik maküler ödem, M: Maküla, NVE: Retinal neovaskularizasyon, NVD: Optik diskte neovaskularizasyon, RD: Retinal damar, OS: Optik sinir) (40).

- **Optik Koherens Tomografi (OKT)**

Optik koherens tomografi (OKT), biyolojik dokularda yüksek çözünürlüklü kesitsel görüntüleme sağlayan, girişimsel olmayan bir görüntüleme yöntemidir. OKT cihazı, retina ve ön segmentin gerçek zamanlı, non-kontakt kesit görüntüleri kullanılmaktadır (114). OKT, retina, optik disk ve maküla gibi anatomik yapıların yüksek çözünürlükte incelenebilmesine fırsat vermesi, girişimsel olmaması, kısa sürede çekim yapılabilmesi gibi sebeplerle oftalmolojide yaygın olarak

kullanılmaktadır (115). Ayrıca OKT görüntülemesi ile retinanın morfolometrik veya kantitatif ölçümleri elde edildiğinden, retina hastalıklarının tanı ve takibinde önemli bir görüntüleme yöntemidir (116). OKT bir kamera gibi yalnızca iki boyutlu görüntü değil, derinlik boyutu ile birlikte daha detaylı bir görüntü sağlamaktadır. OKT'nin aksiyel çözünürlüğü, 8- 10 mikron gibi oldukça yüksek bir değerdir. Böylece dokuya zarar vermeden mikroskop altındaki görüntüye benzer kesitsel görüntüler elde edilir. Bu nedenle, OKT invaziv olmayan doku biyopsisi olarak da tanımlanmaktadır. OKT, dokunun farklı katlarından yansıyan ışıklardaki gecikmeyi hesaplar (113). Dokunun derin katlarından yansıyan ışık, yüzeyden yansıyana göre daha uzun bir gecikme süresi gösterecektir. Optik koherens tomografide görüntü, retina katlarının optik olarak farklı yansıtıcılıkta olması ile elde edilmektedir. Dokulardan geri yansıyan ışığın yoğunluğuna göre gri veya renkli skala kullanılarak kesit görüntüler oluşturulmaktadır. Gri skalada görüntü dokuların yansıtıcılıklarına göre beyazdan siyaha doğru kodlanarak elde edilir. OKT birçok koryoretinal hastalığın tanı, tedavi ve takiplerinde önemli bir seçenek haline gelmiştir (27). Ayrıca, zamanla gelişebilen morfolojik retina değişimlerini takip etme imkanı sağlamaktadır (27, 78, 96, 98, 117). İç retina sınırı olarak vitreoretinal ara yüzeyi ve dış retina sınırı olarak da retina pigment epitel-fotoreseptör katını belirler ve mesafeyi ölçer. Son zamanlarda maküla hastalıklarında intravitreal ilaç ve alternatif laser tedavilerinin güncelleşmesi sonucunda, bu tedavilerin takibinde kantitatif değişimleri göstermesinden dolayı OKT'nin önemi artmıştır (118).

- **Fundus Fluorofotometri (FFFM)**

Fundus fluorofotometri, KRB harabiyatinin kantitatif olarak belirlenmesini mümkün kılan, invaziv, duyarlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Fluorofotometri, antekübital venden fluoreseinin enjeksiyonundan sonra, belirlenen zaman aralıklarında, arka segment yapılarındaki fluoresein düzeyinin ölçülmesi prensibine dayanır (119). Sağlıklı gözlerde KRB'i fluoreseinin vitreusa geçişini engelleyeceğinden ölçülen fluoreseinin düzeyi çok düşük olur. Diyabet gibi patolojilere bağlı olarak KRB harabiyeti olan gözlerde, sistemik dolaşımdan KRB aracılığı ile vitreusa sızan fluoresein, retina ve vitreustaki fluoresein miktarının artmasına sebep olmaktadır (120). Fluorofotometrik veriler, fluoresein

konsantrasyonuna bağlı retinadan korneaya optik eksen boyunca elde edilen bir dizi ölçümleri göstermektedir. Eksende belirlenen noktalarda elde edilen zirve noktaları, ön segment ve arka segmentteki fluoresan miktarına karşılık gelmektedir. Fluorofotometri, diyabetik olgularda vasküler geçirgenlik artışının, sayısal olarak değerlendirilebilmesine imkan vermektedir (121). FFFM hem invaziv bir yöntem olması hem de uygulama ve yorumlamanın zaman gerektirici bir teknik olması sebebiyle klinikte yaygın kullanım alanı bulamamıştır. OKT gibi non invaziv yöntemlerin kullanımının yaygınlık kazanması sebebiyle FFFM sadece araştırma amaçlı olarak çalışmalarda kullanılmaktadır.

2.4.Diyabetik Retinopatide Tedavi İlkeleri

DRP tedavisinde amaç, yeni damar oluşumunu engellemek, damar dışına çıkan sıvıyı azaltmak, hastalığın ilerlemesini engellemek ve görme artışı sağlamaktır. Hastanın klinik özelliklerine göre, DRP tedavisi için lazer tedavisi, farmakolojik ajanlar veya cerrahi tedaviler uygulanabilir. Diyabetik retinopatide görme kaybı, PDR ve DMÖ tablosuna bağlı olarak gelişir (122). DRP'nin bu iki farklı tablosunda, benzer etiopatogeneze rağmen, klinik bulgular farklıdır ve tedavi yöntemleri de farklılık göstermektedir. PDR'nin tedavisinde ilk seçenek tedavi panretinal fotokoagülasyon tedavisi olurken, DMÖ tedavisinde altın standart tedavi farmakolojik ajanlardır (27, 78, 96, 98).

Diyabetik retinopati çalışma grubunun, panretinal fotokoagülasyon yapılan PDR hastalarında 5 yıllık takipte ağır görme kaybı gelişme riskinin %39'dan %13'e düştüğünü bildiren çalışması, PDR tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur (123). O günden günümüze dek geçen, 30 yılı aşkın süredir PDR hastalarının tedavisinde altın standart tedavi seçeneği retinaya uygulanan lazer tedavisidir (panretinal fotokoagülasyon) (27,78, 96, 98). Son dönemlerde, DMÖ tedavisinde kullanılan anti-VEGF tedavilerin, PDR bulguları üzerinde de etkili olduğunu bildiren çalışmalar yayımlanmaktadır (124, 125).

2.4.1. Diyabetik Maküler Ödem Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

DMÖ tedavisinde günümüzde altın standart yöntem farmakolojik tedavidir. İntravitreal yolla uygulanan farmakolojik ajanlar, hastalarda hem anlamlı düzeyde görme artışı hem de maküla anatomisinde düzelme sağlamaktadır. Diyabetik maküler ödem tedavisi için klinikte kullanılan ve henüz geliştirilme aşamasında olan pek çok farklı ilaç vardır (22).

a) Anti-VEGF Etkiye Sahip İlaçlar

VEGF damar dışına sıvı sızıntısı ve maküler ödem gelişimine yol açan KRB harabiyetinin en önemli mediyatörüdür (122). Anti-VEGF ajanlar VEGF etkilerini bloke ederek, VEGF'ün yol açtığı vasküler geçirgenliği etkin biçimde engellemektedir. Günümüzde anti-VEGF etkili ilaçlar DMÖ tedavisinde altın standart tedavi yaklaşımıdır (4, 12). Diyabetik maküler ödem tedavisinde intravitreal anti-VEGF etkili ilaçların, klinik kullanıma girmesi DMÖ tedavisinde bir devrim olarak tanımlanabilir. Anti-VEGF etkili ilaçların kullanıma girmesinden önceki dönemde kullanılan tedavi yöntemlerinde en önemli hedef hastanın o anda varolan görme düzeyinin korunması (126) iken anti-VEGF etkili ilaçlarla birlikte hastanın, hastalık öncesi görme düzeyini tekrar kazanması gündeme gelmiştir. Anatomik iyileşme için de benzer durum sözkonusudur. Günümüzde maküla merkezini tutan DMÖ olgularında retina uzmanlarının %90'ı ilk seçenek olarak anti-VEGF ilaçları tercih etmektedir (12). Klinikte yaygın olarak kullanılan üç tane anti-VEGF ilaç mevcuttur:

- **Ranibizumab**

Ranibizumab (Lucentis®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) 48 kDa ağırlığında, rekombinant monoklonal anti-VEGF bağlayıcı fragmandır. Göz dokusunda kullanılmak için özel olarak üretilmiştir. VEGF-A'nın tüm izoformlarını ve yıkım ürünlerini bloke eder (75). Ranibizumab, DMÖ tedavisinde kullanımı için 2012 yılında FDA onayı almıştır. Kısa ürün bilgisinde tedavinin aylık olarak verilmesi ve maksimum görme keskinliğine erişilene kadar ya da 3 ardışık vizitte görme stabil oluncaya kadar tedaviye devam edilmesi önerilmektedir. Literatürde ranibizumabın

DMÖ tedavisinde etkinliğini ve güvenilirliğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (2, 27, 93, 99, 127).

- **Aflibercept**

Aflibercept (Eylea®; Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY, USA) 115 kDa ağırlığında, VEGF-A, VEGF-B ve PGF'ye bağlanabilen rekombinant füzyon proteindir. Diyabetik maküler ödem tedavisi için FDA onayını 2015 yılında almıştır. Tedavi şemasında, beş ay süre ile aylık intravitreal enjeksiyonlardan oluşan yükleme dozu sonrası iki aylık uygulamalar önerilmektedir. Diyabetik maküler ödem tedavisinde etkin ve güvenilir olduğu pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Halen dünyada diğer a-VEGF etkili ilaçlar ile birlikte çok yaygın olarak kullanılmaktadır (27, 93, 99, 128).

- **Bevasizumab**

Bevasizumab (Avastin®, Altuzan®; Genentech) 149 kDa ağırlığında, rekombinant humanize VEGF antikordur. İnsan VEGF-A'sına karşı rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen bir monoklonal antikordur. VEGF-A molekülünün tüm izoformlarına bağlanma özelliğine sahiptir (27, 93, 99). Bevasizumab kolon kanseri için endikasyon almış bir moleküldür, gözde kullanım için üretilmemiştir ve endikasyonu yoktur. Faz III çalışması olmamasına rağmen tüm dünyada *endikasyon dışı* olarak kullanılmaktadır. Bevasizumab'ın DMÖ'de etkili olduğu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (22, 122, 126, 129). Bevasizumab, diğer endikasyonlu ürünlerle karşılaştırıldığında, maliyeti en düşük olan ilaçtır. Bevasizumabın bir enjeksiyonu 50 dolar olurken, ranibizumab ve aflibersept için bu maliyet bir enjeksiyonluk doz için yaklaşık 2000 dolar olarak bildirilmektedir (129, 130). Dünyada DMÖ tedavisinde ve bazı diğer göz hastalıklarının tedavisinde endikasyon dışı olarak en yaygın olarak kullanılan anti-VEGF etkili ilaçtır (27, 93, 99). Çok merkezli çalışmalarda üç aylık intravitreal yükleme dozu sonrası aylık intravitreal uygulamalar şeklinde uygulanması önerilmektedir.

b) Steroidler

DRP gelişiminde enflamasyonun çok önemli bir rolü vardır (80). Steroidler de güçlü antiinflatuar ve anti ödem etkinlikleri sayesinde DRP tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (131). Kortikosteroidlerin anti inflamatuvar etkisi, fosfolipaz A2 inhibisyonu ile araziidonik asit yolağının blokajı ile sağlanır (81). DMÖ tedavisinde kullanılan steroidler enflamasyonu baskılayıcı etkilerinin yanında VEGF sekresyonunu da baskılayarak hem fonksiyonel hem anatomik iyileşme sağlamaktadır. DMÖ tedavisinde anti-VEGF etkili ajanlarla birlikte intravitreal uygulanan steroidler de çok etkili seçenekler olup tüm dünyada DMÖ tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (132). Özellikle yeni geçirilmiş serebrovasküler olay ve miyokard enfarktüsü gibi anti-VEGF tedavinin kontrendike olduğu durumlarda tercih edilir. DMÖ'nin tedavisinde steroid etkin maddeli ilaçlar peribulber enjeksiyon, intravitreal enjeksiyon ya da intravitreal implantlar şeklinde uygulanmaktadır (83). Güncel kullanımda triamsinolon asetonid, deksametazon ve fluosinolon asetonid olmak üzere üç farklı intravitreal steroid mevcuttur.

- **Triamsinolon asetonid**

Hidrokortizondan 5 kat daha güçlü anti-enflamatuvar güce sahip sentetik bir steroiddir. Günümüzde DMÖ tedavisi için 4 mg triamsinolon asetonidin intravitreal uygulaması endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır (131).

- **Deksametazon**

Çok güçlü antiinflatuar etkinliği olan bir moleküldür. Ancak hidrofilik yapısı sebebiyle vitreusta çok çabuk yıkılır ve yarı ömrü 5,5 saat gibi çok kısa bir süredir (133). Bu nedenle serbest ilaç içeren formu klinik uygulamalarda tercih edilmemektedir. Ozurdex® (Allergan Inc., Irvine, CA), poli (lakto-glikolid) taşıyıcıya yüklenmiş 0,7 mg deksametazon içeren biyobozunur özellikte bir intravitreal implanttır. Günümüzde dünyada en sık kullanılan intravitreal modifiye salım formu Ozurdeks®tir® (134). Ülkemizde de TİTCK tarafından DMÖ tedavisi için endikasyonu vardır. Ozurdeks® implant, 6,5 x 0,45 mm boyutlarındadır ve 22 G iğne yardımı ile

intravitreal enjeksiyon olarak uygulanmaktadır. Kontrollü salım özelliği nedeniyle 6 aya kadar etkilidir. Deksmetazon implantın yarar ve zarar oranı göz önüne alınarak psödo faklarda veya steroid dışı tedavilere cevap vermeyen ya da bu tedavilerin uygun olmadığı hasta grubunda kullanımıyla sınırlı olmaktadır.

- **Fluosinolon asetonid**

İntravitreal olarak ticari iki farklı tipte yavaş salımlı ilaç taşıyıcısı sistemi mevcuttur; Retisert® (Bausch&Lomb, Rochester, NY, ABD) ve Iluvien® (Alimera Sciences, Atlanta, GA, ABD). Ancak her iki sistemde ülkemizde bulunmamaktadır. Iluvien® (Alimera Sciences, Atlanta, GA, ABD), biyoyıkıma uğramayan daha küçük bir implant olup DMÖ tedavisi için onaylıdır. 25 G iğne kullanılarak vitreusa enjekte edilir ve 0,2 µg/gün aktif madde salımı yapar (135). Retisert® 0,59 mg fluosinolon asetonid içeren biyoyıkıma uğramayan bir implanttır. Pars plana kesisinden yerleştirilir ve skleraya sütüre edilir. Otuz aya kadar devamlı ilaç salımı yapar. İmplantasyondan sonra başlangıçta 0,6 µg/gün steroid salınımı yapar, 1. aya kadar azalarak yaklaşık 0,3-0,4 µg/gün oranında sabitlenir (136).

c) Steroid Olmayan Anti-İnflamatuar Etkili İlaçlar

Non steroid antiinflamatuarlar (NSAI) Cox-2 enzimini inhibe ederek inflamasyonun çok güçlü bir mediyatörü olan prostoglandin üretimini baskılar (137). İnflamasyonu bastırmadaki bu güçlü etkilerinden dolayı NSAI, göz hastalıklarında özellikle, oküler inflamasyonun tedavisi, ameliyat sürecinde pupil dilatasyonunun sağlanması, refraktif cerrahi ile ilişkili postoperatif ağrıyı ve fotofobiyi azaltabilmek ve alerjik konjonktivit ile ilişkili kaşıntıyı azaltabilmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (82, 138,). NSAI etkili ilaçlar, bu etkilerinin yanında çok uzun zamandır DMÖ'de ve üveit, ven dal tıkanıklığı, katarakt sonrası gelişen kistoid maküler ödem gibi farklı etiyolojilere sahip maküler ödemin tedavisinde de kullanılmaktadır (139). Nepefenac etken maddesini içeren Nevanac® (Nevanac, Alcon Lab) diyabet hastalarında katarakt ameliyatı sonrası gelişebilecek maküler ödemin önlenmesi için endikasyonlu olarak kullanılmaktadır (140). NSAI'ların maküler ödem tedavisindeki olumlu etkilerine rağmen, kullanımının sınırlı olmasının

en önemli sebebi ilacın göze uygulama yoludur. Topikal uygulanan farmasötik formların arka segmente geçişi çok düşük olduğundan bu durum etkinliği azaltmaktadır (11). Son dönemde intravitreal uygulanan NSAI'nin DMÖ tedavisinde etkinliğini araştıran çok sayıda çalışma bu uygulamaların DMÖ tedavisinde anlamlı düzeyde etkili olduğunu göstermektedir (141-143). NSAI'ların vitreustaki konsantrasyonunu uzun süre korumak için, intravitreal uygulamalara ek olarak arka segment uygulamalarına yönelik kontrollü salım formlarının geliştirilmesi konusunda da çalışmalar vardır (144).

d) Karbonik Anhidraz İnhibitörleri (KAI)

KA'lar, canlılarda çok yaygın olarak bulunan, pH düzenlenmesi ve lipogenez, ürogenez ve glikoneogenez gibi metabolik olaylarda önemli rol oynayan bir metallo enzim ailesidir (145). İnsanda 15 farklı KA alt grubu tanımlanmıştır (146). KA'lar CO₂'in, proton açığa çıkararak HCO₃⁻'e dönüştüğü reaksiyonu geri dönüşümlü olarak aktive ederler. CO₂'in, HCO₃⁻'e dönüşümü organizmada, pek çok hayati reaksiyonu birbirine bağlayan, en temel reaksiyondur. Karbonik anhidraz reaksiyonu, santral sinir sistemi, göz, böbrekler ve pek çok dokuda mevcuttur (146). Gözde kornea epiteli, silier cisim, iris, lens, Müller hücreleri, kırmızı-yeşil koniler ve RPE'de KA enziminin varlığı gösterilmiştir (110, 147). 1940'lı yıllarda KA enziminin, silier cisimden aköz hümor üretilmesindeki rolünün keşfedilmesini takiben, karbonik anhidraz inhibitörü (KAI) etkili ilaçların göz içi basıncını düşürücü etkisi bildirilmiştir (148-149). KAI etkili ajanlar 1950'li yıllardan beri, glokom tedavisinin önemli bir parçası olmuştur (146, 149). KAI etkili ilaçların maküler ödem tedavisindeki rolü ile ilgili etkinlik bildiren ilk çalışma 1988 yılında yayınlanmıştır (150). Daha sonra yapılan pek çok deneysel ve klinik çalışmada KAI etkili ilaçların maküler ödem tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (23-25, 104). Klinik pratikte de KAI etkili ajanlar endikasyon dışı olarak bu endikasyon için tercih edilebilmektedir. ACZ, metazolamid ve diklorofenamid, birinci nesil sülfonamid grubu KAI etkili ilaçlardır (146).

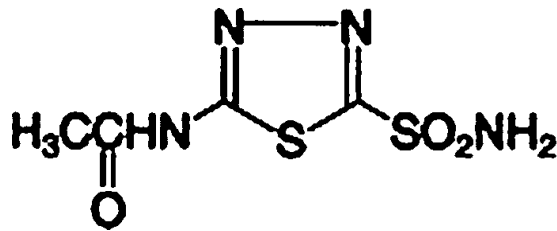
- **Asetazolamid**

Asetazolamid (ACZ), KA enzim inhibitörleri ailesinin prototipi ve ilk tanımlanan üyesidir. ACZ, güçlü bir KAI etkiye sahiptir. KA enziminin inhibisyonu, ortamda KA birikimine ve ortamın pH'sının asidik yöne kaymasına sebep olur. KA inhibisyonu ile sodyum, bikarbonat ve klorür kanalları ile birlikte taşınan sıvı taşınımı da engellenir. Sodyum, bikarbonat ve klorür geri emilmeden dışarı atılırken, bu iyonlarla birlikte taşınan su da taşınmadığı için fazla su da dışarı atılır (151).

Terapötik Endikasyon

ACZ'nin endikasyonlu veya endikasyon dışı olarak kullanıldığı pek çok hastalık vardır (152-153). Glokom, intrakranial hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, epilepsi gibi hastalıklarda onaylı kullanımının yanı sıra, santral uyku apnesi, Marfan sendromunda görülen dural ektazi ve metotraksat ilişkili böbrek yetmezliğinde de endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır.

Asetazolamid (2-asetamido-1,3,4-tiadiazol-5-sülfonamid, N-(5-sülfomoiil-1,3,4, tiadiazol-2-il) asetamid'dir ($C_4H_6N_4O_3S_2$, MA: $222.24 \text{ g mol}^{-1}$)'nin kimyasal yapısı Şekil 2.10'da sunulmuştur (154).



Şekil 2.10. Asetazolamidin Yapısı (154).

Terapötik İndeks ve Toksikite

ACZ kullanımında doza bağlı pek çok yan etki gelişebilir. Bunların başlıcaları, epigastrik yanma, bulantı, ishal ve metabolik asidozdur (155,156). Tavşanlarda terapötik endeksi 2,7 olarak bildirilmiştir (157). ACZ kullanımına bağlı olarak nadiren

görülen trombositopenik purpura, pansitopeni ve aplastik anemi gibi hayatı tehdit edici kan diskrazileri gelişimi rapor edilmiştir (158-160).

Kimyasal Özellikleri

ACZ'nin, parenteral formunda yer alan sodyum tuzu mevcuttur (155, 161). Asetazolamidin iki farklı polimorfik formu mevcuttur (Form I ve II). Form I'in 37°C'deki çözünürlük ve disolüsyon hızı, Form II'nin aynı koşullardaki çözünme hızınının 1.1 katıdır (162) ancak bu küçük fark, ACZ'nin biyoyararlanımı üzerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamaktadır (163).

ACZ suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir (0,72 mg/mL, 258 °C; 157). Alkolde (3,93 mg/mL) ve asetonda çok az çözünürken; CCl₄, kloroform ve eterde çözünmez (164). pH 1.68 ve pH 8.17 değerleri arasındaki çözünürlük değerleri 0.8–2.8 mg/mL (258 °C) olarak rapor edilmiştir (165). ACZ zayıf asidik yapıda olup pKa değeri 7,2'dir (157). Dünya Sağlık Örgütü'nün tarafından önerilen doz 250 mg'dır (166).

- **Farmakokinetik Özellikleri**

Absorbsiyon

ACZ'nin, oral uygulama sonrası gastrointestinal kanaldan hızlı bir şekilde tamamen emildiği (%100) ve 1-3 saatte doruk plazma konsantrasyonuna ulaştığı bildirilmiştir (157, 167). İnsanda, birinci derece absorpsiyon hız sabiti 0.821 sa⁻¹ olarak rapor edilmiştir (156). Plazma konsantrasyonu, uygulama dozu ile doğru orantılıdır. Gıdalarla birlikte alınması absorpsiyonu etkilemez (168). Terapötik serum konsantrasyonu hastadan hastaya değişiklik göstermekle birlikte genelde 10–20 mg/mL'dir (glukom tedavisinde 4–5 mg/mL'dir) (169).

Dağılma, Metabolizasyon ve Eliminasyon

ACZ %70-90 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Dağılma hacmi 0.2 L/kg'dır. Santral sinir sistemi de dahil olmak üzere tüm vücuda dağılır. Asetazolamid

metabolize edilmez ve uygulanan dozun %90'ı 24 saat içinde idrarla değişmeden atılır. Böbreklerden itrah aktif tübüler sekresyon ve reabsorbsorbsiyon aşamalarından oluşur (157, 167). Yaşlı hastalarda eritrositlerde birikebilir, bu durum konsantrasyona bağlı yan etkilerin bu yaş grubunda daha sık görölmesine sebep olur. İleri böbrek yetmezliği olan hastalarda plazma yarılanma ömrü 26 saate kadar uzayabilir ACZ'nin anne sütüne de geçtiği rapor edilmiştir (164).

Biyofarmasötük Sınıflandırma Sistemine Göre Sınıflandırılması

ACZ, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) ve Biyofarmasötik İlaç Dispozisyon Sınıflandırma Sistemine (BDDCS) göre sınıf IV (düşük, düşük permeabilite ve düşük meatbolizasyon) olarak tanımlanmıştır (170, 171). Ancak literatürde ACZ'nin çözünürlük ve permeabilite değerlerine ait yeterli veri olmaması sebebiyle, ACZ'nin farmasötik sınıflandırma sistemlerinde doğru bir şekilde değerlendirilebilmesinin mümkün olamayacağını savunan yazarlar da bulunmaktadır (154, 172).

ACZ'nin maküler ödem tedavisindeki etkinliği uzun yıllardır bilinmektedir (22). Oral asetazolamid uygulamasının maküler ödem tedavisindeki etkileri ilk olarak 1988'de kronik üveitik maküler ödem tanısı olan bir seride bildirilmiştir (150). Daha sonra maküler ödem tedavisinde ACZ'nin kullanımına ilişkin pek çok klinik çalışma yayımlanmıştır (23,173). ACZ'nin maküler ödem tedavisindeki etki mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen etkili olduğu düşünölen iki önemli etki mekanizması; RPE hücrelerindeki KA enzimi üzerindeki etkileri ve vitreustaki KKS üzerindeki etkileridir (21-24).

• Asetazolamidin KA enzimi üzerindeki etkileri

ACZ'nin DMÖ tedavisindeki en uzun süredir bilinen etkisi RPE hücrelerindeki KA enzimi üzerindeki inhibitor etkisidir. Bu alanda yapılan deneysel çalışmalar, asetazolamidin, RPE üzerindeki etkilerinin farklı mekanizmalardan kaynaklanmış olabileceğini göstermektedir. ACZ vasküler geçirgenliği azaltarak, vitreus fluorofotometri ölçümlerinde fluoresein sızıntısını azaltır (174). İntravenöz uygulanan

ACZ hem normal koşullarda hem de deneysel retina dekolmanı hastalık modelinde, subretinal sıvının koroide pompalanmasını %25 oranında artırır (22, 100, 109). Sıvı pompalanmasındaki bu artış, hem KA enziminin polarizasyonundan ve etkinliğinin artmasından hem de hücrelerarası alandaki pH'nın kontrol edilmesinden kaynaklanır (21,151).

İntravenöz uygulanan ACZ'nin kedilerde, uygulamadan 45 saniye sonra pH derecesini 0,2 ünite azalttığı gösterilmiştir. Asidik ortam oluşmasından sonra subretinal sıvıda hızlı bir azalma bildirilmiştir. Ortamın pH değeri nin asidik değere kaymasının, iyon transferini ve iyon-ilişki li su transferini artırarak subretinal sıvıyı azalttığı savunulmaktadır (175).

- **Asetazolamidin KKS üzerindeki etkileri**

Son dönemde yapılan çalışmalar, ACZ'nin RPE üzerindeki etkisinden farklı, özgün bir etki mekanizması daha olduğunu göstermektedir (176, 177). Bu etki asetazolamidin KSS aktivasyonunu baskılayıcı etkisidir. Diyabetik hastaların vitreuslarında yapılan proteomik analizler, diyabetik hastaların vitreuslarındaki KA enzim düzeyinin, diyabetik olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak proliferatif DRP'li olgularda, vitreus KA enzim düzeyinin NPDR olgularına göre de 8,3 kata kadar yükseldiği gösterilmiştir (177). Bu yüksek KA düzeyi, vitreus pH'sını alkali değere kaymasına sebep olmaktadır. Bu yüksek pH değeri nin, DRP bulgularının gelişiminde çok etkili rol oynadığı, pH değeri lerinin normal değere getirilmesinin, DRP bulgularında tedavi edici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu hipotezi desteklemek için, deneysel çalışmalarda, purifiye edilmiş intravitreal KA-1 verilen sıçanlarda, FFA incelemesinde erken evrede retinal damarlardan sızıntının arttığı gösterilmiştir. Sham enjeksiyonu yapılan grupta ise benzer etki görülmemiştir. Öte yandan başka bir gruba, KA-1 ile birlikte intravitreal asetazolamid uygulanmıştır. Bu grupta da FFA incelenmesinde herhangi bir sızıntı izlenmemiştir (21). Vitreusta artmış KA düzeyinin DRP bulgularını arttırmadaki etkisinin, artmış pH değeri lerine bağlı olarak plazma Kallikrein Kinin sisteminin aktive ettirilmesinden kaynaklandığı belirtilmektedir. ACZ'nin de, vitreusun pH değeri ni

dengeleyerek dolaylı KKS inhibisyonu ile DRP tedavisinde etkili olduğu savunulmaktadır (176, 178).

Plazma KKS aktivasyonunun DRP gelişiminde hem retinal damarlarda vasküler geçirgenliği arttırıcı ve hem de anjiyogenezi uyarıcı etkileri vardır (178). Plazma KKS'nin DRP gelişimindeki bu etkilerinin gösterilmesi, KKS inhibisyonunun DRP tedavisinde etkili bir hedef yolak olabileceği fikrinin doğmasına sebep olmuştur. Bu yönde yapılan çalışmalarda, KKS aktivasyonunun genetik ve farmakolojik olarak bastırılmasının DRP tedavisinde etkin bir tedavi mekanizması olduğu gösterilmiştir (179). Pek çok plazma KKS inhibitörünün DRP tedavisine yönelik faz çalışmaları devam etmektedir (90).

ACZ, tüm KAI etkili etkin maddeler arasında göz içi basıncını düşürücü etkisi en yüksek olan moleküldür. Ancak oküler biyoyararlanımının düşük olması sebebiyle sadece sistemik olarak kullanılabilir. Maküler ödem tedavisi için de benzer bir durum sözkonusudur (23, 175). Göz içinde etkin konsantrasyonun sağlanması için uzun süreli yüksek doz oral uygulamalar gerekmektedir (180). Benzer durum endikasyonlu olduğu diğer hastalıkların tedavisi için de geçerlidir. KA enziminin 15 alt grubu tanımlanmıştır. Bu alt gruplar insan vücudunda çok yaygın bir dağılım gösterir (146). Bu nedenle sistemik ACZ uygulamalarının ciddi yan etkileri olabilmektedir. En yaygın yan etkileri; metabolik asidoz, respiratuar asidoz ve diürezdir (161). ACZ'nin diğer yan etkileri ise, halsizlik, kırgınlık, gastrointestinal bozukluklar, deride yanma, kilo kaybı, libido azalması, depresyon, tat değişikliği, kan diskrazisi, iştahsızlık, idrar taşı oluşumu ve renal taş oluşumudur (182, 183). Olası sistemik yan etkiler asetazolamidin yaygın kullanımının önündeki en önemli engeldir (23, 175).

2.4.2. Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntravitreal Enjeksiyonlara Bağlı Gelişebilecek Yan Etkiler

İntravitreal tedaviler DMÖ başta olmak üzere arka segment segment hastalıklarında önemli düzeyde anatomik iyileşme ve görsel kazanç sağlamaktadır. Bununla birlikte intravitreal tedavilerde hem uygulanan etkin maddeye bağlı olarak

hem de uygulama tekniğine bağılı olarak ciddi lokal ve sistemik komplikasyonlar gelişme riski mevcuttur (5).

a) Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntravitreal Enjeksiyonlara Bağılı Gelişebilecek Lokal Yan Etkiler

- **Endoftalmi**

Endoftalmi genellikle enfeksiyona bağılı olarak gelişebilen aköz sıvı ve vitreusu etkileyen göz içi inflamasyondur. Endoftalmi uygun yöntemlerle tedavi edilmezse görme kaybına, göz kaybına ve enfeksiyonun göz komşuluğundaki diğerk dokulara yayılımına sebep olabilir. Bu nedenlerle endoftalmi göz hastalıkları alanında en korkulan durumların başında gelir. İntravitreal enjeksiyon sonrası endoftalmi gelişimi riski farklı çalışmalarda, %0,06-0,07 % arasında bildirilmektedir (184, 185). İntravitreal enjeksiyonların pek çok ülkede ameliyathane ortamında steril şartlarda yapılması enjeksiyon sonrası enfeksiyöz endoftalmi gelişme riskinin anlamlı oranda azalmasını sağlamıştır. Ancak, göz ve görme kaybına yol açma riski nedeni ile halen en çok korkulan komplikasyonlardan biridir. Nadiren, intravitreal steroidlerin göz içinde sebep olduğu geçici immün baskılanmış durum, sitomegalovirüs retiniti gibi fırsatçı ajanların sebep olduğu enfeksiyöz tablolara sebep olabilir. Birliktelik gösteren diyabet gibi sistemik hastalığı olan, çok sayıda intravitreal enjeksiyon tedavisi yapılmış hastalarda bu oran daha yüksektir (186, 187).

- **Enfeksiyöz olmayan üveit**

Enfeksiyöz olmayan üveit, enfeksiyöz ajanların değil, uygulanan ilaçtaki bir maddenin tetiklediğı düşünölen, tedavi gerektirmeden iyileşen akut intraoküler vitreus inflamasyonudur (27). Farklı serilerde intravitreal enjeksiyonlardan sonra % 0,09-1,1 oranında geliştiğı bildirilmektedir (188, 189). Ön kamarada fibrin ve korneada keratik presipitatlar ile karakterizedir. Enfeksiyöz endoftalmi tablosu ile ayırımı zor olduğı için önemli bir klinik tablodur.

- **Retina Dekolmanı**

Retina dekolmanı, retina pigment epitelyum tabakası ve nörosensoryel tabakaların birbirinden ayrılması ve subretinal alanda sıvı birikimi ile seyreden klinik tablodur (27). Tedavi edilmezse görme kaybı ve ilerleyen süreçte göz dokusunun kaybına yol açabilir. intravitreal uygulamalardan sonra retina dekolmanı gelişmesi nadiren gelişebilen, ciddi bir komplikasyondur. Enjeksiyon sırasında retinaya doğrudan travma nedeniyle veya vitreus harabiyetine bağlı arka vitreus dekolmanının tetiklenmesine bağlı olarak gelişmiş olabileceği ileri sürülmektedir. Çok merkezli çalışmalarda, enjeksiyondan 2-6 gün sonra, 0,013-0,080 oranlarında gelişebildiği bildirilmektedir (190).

- **Retinal Atrofi**

VEGF, sağlıklı retina dokusunda, hücrelerin devamı için çok önemli düzenleyici role sahiptir (75). İntravitreal uzun süreli anti-VEGF etkili ilaçların kullanımı, normal VEGF düzeyini de baskıladığı için makülada ciddi atrofi gelişimine yol açabilmektedir (191, 192). Atrofi gelişim riski, daha sık enjeksiyon yapılan hastalarda daha fazladır (173). DMÖ tedavisi için anti-VEGF tedavisi alan hastalarda, atrofi gelişimine bağlı olarak retina kalınlığının incelendiği ve kalıcı harabiyet gelişebildiği bildirilmektedir (194).

- **Göz içi Basıncı Yüksekliği**

Hem steroidlere hem de anti-VEGF etkili ilaçlara bağlı göz içi basıncı yüksekliği gelişebilmektedir. Göz içi basıncının yükselmesine sebep olan temel mekanizma aköz dışı akıma karşı rezistans gelişimidir. Bu rezistans, trabeküler ağda mikro düzeyde yapısal değişiklikler, trabeküler ağda madde birikimi, trabeküler ağdaki endotelial fagositozun baskılanması gibi pek çok farklı mekanizmaya bağlı olarak gelişebilmektedir. İntravitreal steroid etken madde içeren ilaç uygulanan hastaların %50'sinden fazlasında, oküler hipertansif cevap gelişmektedir (195). Steroidler kadar yüksek oranda olmasa da anti-VEGF etkili ilaçların kullanımından sonra da göz içi basıncı yüksekliği gelişebilmektedir (196).

- **Katarakt**

Daha çok steroid etkili tedavilerin uygulanmasına bağlı olarak gelişir. Genelde arka kapsüler katarakt gelişimi izlenir. Steroidlerin indüklediği pek çok farklı mekanizmaya bağlı olarak geliştiği ileri sürülmektedir. İlk yıl %13 ile %56 arasında, tedavinin üçüncü yılında ise %68 oranında katarakt gelişimi riski bildirilmiştir (197, 198).

- **Ön Kamaraya Yer Değiştirme**

Göz içine uygulanan intravitreal implantlar, ön kamaraya geçebilir (179). Vitrektomi ameliyatı geçirmiş riskli gözlerde %4,8-5,9 oranında gelişebilen bu durum, korneal dekompanasyon, ödem ve oküler hipertansiyona sebep olabilir (200).

- **Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntavitreal Enjeksiyonlara Bağlı Gelişebilecek Sistemik Yan Etkiler**

Sistemik yan etki olarak ani kan basıncı yükselmesi, iskemik koroner arter hastalığı, serebrovasküler olay, periferik tromboemboli bildirilmiştir (201).

2.4.3. Diyabetik Retinopati Tedavisinde İntavitreal Enjeksiyonlara Cevapsızlık

İntavitreal anti-VEGF etkili ilaçlar DMÖ tedavisinde hem anatomik düzelme hem de görme düzeyinde anlamlı artış sağlayan etkin tedavi yöntemleridir. Bununla birlikte %30-50 arasında hastada tedaviye cevap alınmamaktadır (202-206). Bu cevapsızlıkta, retinada yapısal değilişiklerin veya VEGF'den bağımsız yolakların da etkili olabileceği düşünölmektedir (84, 179, 207-209). Bu nedenlerle KA ve KKS gibi VEGF'den bağımsız yolaklarda da etkili yeni moleküllerin DRP tedavisinde kullanımı ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır (21, 106).

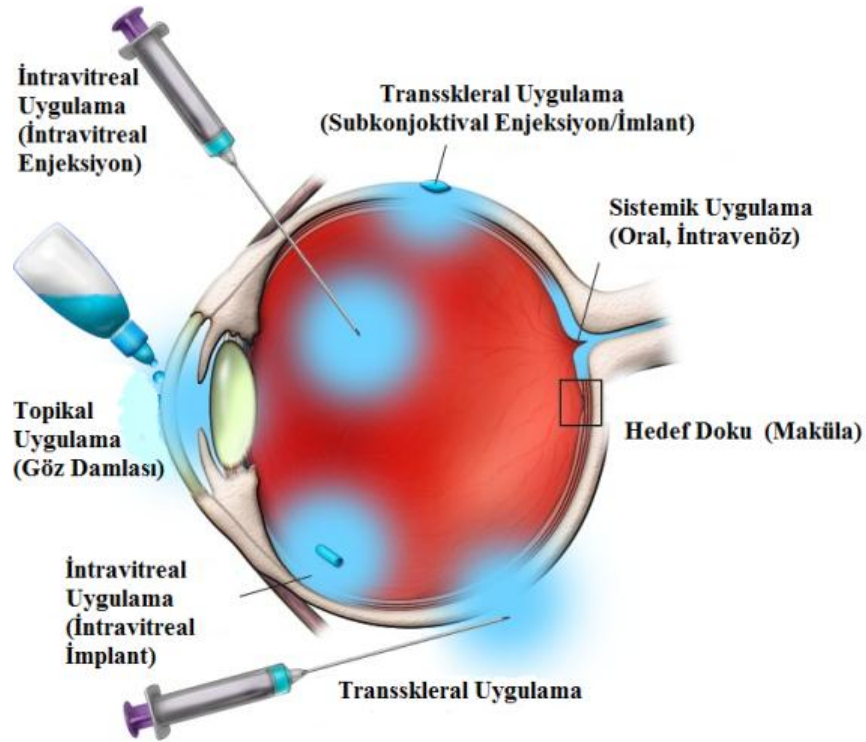
2.5. Oküler İlaç Taşınımı

Ön segmenti ve arka segmenti etkileyerek görme kaybına sebep olabilen hastalıkların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için bu bölgelerde terapötik ilaç konsantrasyonunun sağlanması ve hedeflenen süre boyunca korunması gerekmektedir. Göz, yüksek nöronal aktiviteye sahip hücre gruplarından oluşan kompleks bir duyu organıdır. Göz dokularının metabolik ihtiyaçları, sahip oldukları hassas yapı ve fonksiyonlar nedeniyle vücuttaki diğer dokulardan farklıdır. Farklı fizyolojik ve histolojik özelliklere sahip bu hücre gruplarının yüksek metabolik ihtiyaçlarının sağlanabilmesi için gözün kendine has bir mikroçevresi vardır. Bu mikroçevre, göze dışarıdan madde girişinin statik ve dinamik bariyerler tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi ile oluşturulur (210). Statik ve dinamik bariyerler, göze yabancı madde girişini sıkı bir şekilde kontrol ederek, göz dokularının ihtiyaç duyduğu pH, sıcaklık, sıvı elektrolit dengesi gibi özel koşulların sürdürülmesini sağlarlar. Bu bariyerler aynı zamanda gözün ön segment ve arka segment yapılarına, yabancı maddelerin geçişini önler (6,7). Öte yandan göze uygulanan ilaçların ön segment ve arka segmente ulaşımını da engelleyerek oküler ilaçların biyoyararlanımını azaltır (211). Gözdeki ön segment ve arka segmenti etkileyen hastalıkların tedavisi için ön segmente ve arka segmente uygulanan ilaçların biyoyararlanımı, gözdeki koruyucu bariyerler nedeniyle çok düşüktür (8).

2.6. Posterior Segmente İlaç Ulaştırma Yolları

Göze dışarıdan uygulanan topikal tedavilerin göz dokularına geçişinde, hem statik (korneal epitel, korneal stroma, korneal endotelyum, kan aköz bariyeri) hem de dinamik bariyerler (gözyaşının dilüsyonu, konjunktiva) ilaç geçişini azaltarak biyoyararlanımı etkiler (6-8). Arka segment dokularından, sklera, koroidal yüksek kan akımı, iç ve dış kan retina bariyerleri oküler ilaç biyoyararlanımını azaltan diğer önemli faktörlerdir (212). İç ve dış kan bariyerinin yapısındaki sıkı bağlantıların yanı sıra, *effluks* proteinleri de özellikle bazı ilaçların arka segmente geçişinin önemli ölçüde kısıtlanmasından sorumludur (8-11). Gözün arka segmenti, tüm vücutta ilaç uygulama, uygulanan ilaç düzeyinin terapötik doza ulaşmasını sağlama ve bunu istenen sürede koruyabilme açısından en zor bölgelerden biridir. Tüm bu nedenlerle

özellikle posterior segmente ilaç taşınımı ve posterior segmentte uzun süreli hedef ilaç konsantrasyonunun sağlanması, karşılanmamış pek çok ihtiyacı barındıran bir alandır (8). Günümüzde, arka segmente ilaç uygulamalarında geleneksel yöntem intravitreal uygulamalar olmakla birlikte, klinik uygulamada çok daha nadiren tercih edilen, topikal, sistemik ve perioküler uygulama yolları da mevcuttur (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Posterior segmente ilaç ulaştırma yolları (193).

2.6.1. Topikal Uygulamalar

Topikal uygulamalar, nispeten kolay ve daha az riskli bir ilaç uygulama yöntemidir. Ancak bu yol arka segmente ilaç uygulamalarında sık tercih edilen bir yol değildir. Çünkü, topikal yolla uygulanan bir ilacın sadece %5'i göze ulaşır ve bunun da sadece çok küçük bir kısmı (%0.001) arka segmente ulaşabilir (214).

Bu nedenle topikal uygulanan damlaların arka segment uygulamalarına yönelik biyoyararlanımları çok düşüktür ve arka segmente ilaç uygulama amacıyla günlük uygulamalarda nadiren tercih edilirler (8, 11).

2.6.2.Perioküler Uygulamalar

Perioküler yol, ilaçların gözü çevreleyen bölgeye uygulanmasını ifade eder ve subkonjonktival, sub-tenon, peribulbar, posterior jukstaskleral ve retrobulbar enjeksiyonları içerir (8, 11). Lokal anestezi altında tekrarlayan perioküler uygulamalar yapılması mümkündür. Perioküler uygulamalar, arka segment hastalıklarının tedavisinde, tek başına veya intravitreal ajanlarla birlikte zaman zaman tercih edilebilen yöntemlerdir (8, 11, 211). Perioküler yol intravitreal yola oranla daha az invaziv ama daha düşük biyoyararlanım sağlayan bir uygulama yoludur (216, 217). Perioküler uygulamalar, topikal uygulama yolu ile karşılaştırıldığında (yaklaşık%0,001 veya daha az), daha iyi bir retinal ve vitreal ilaç biyoyararlanımı (yaklaşık% 0,01-0,1) sağlarlar (216). Bununla birlikte, perioküler uygulama sonrası elde edilen intravitreal etkin madde konsantrasyonları bireyler arasında büyük farklılık göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı henüz perioküler uygulama için endikasyon almış herhangi bir ticari preparat mevcut değildir, o nedenle endikasyon dışı olarak uygulanmaktadır (8, 11, 211, 216).

2.6.3.Sistemik Uygulamalar

Oral, intramusküler veya intravenöz uygulanabilen sistemik tedavilerde iç ve dış KRB'nin seçici geçirgenlik özelliği sebebiyle göze çok az geçiş söz konusu olup biyoyararlanım çok düşüktür (%1-2)(218). Bu nedenle vitreusta hedef dozun sağlanabilmesi için, ilaçların çok yüksek dozda kullanılmaları gerekir (219). Sistemik etkili ilaçların yüksek dozda kullanımı yan etki gelişimi açısından yüksek riskli olduğundan, bu uygulama yolu, sadece endoftalmi tedavisinde antimikrobiyal ajanların kullanımı, sistemik hastalıklara bağlı gelişen üveit ataklarında immünsüpresif ilaçların kullanımı ve ciddi göz içi basıncı yüksekliği gibi durumlarda kısa süreli olarak tercih edilirler (8, 11)

2.6.4. İntravitreal Uygulamalar

İntravitreal enjeksiyonlar, arka segment hastalıklarının tedavisinde en sık tercih edilen uygulama yöntemidir (220, 221). İntravitreal enjeksiyonlar, 27-30 G iğne ucu

kullanılarak, limbusun 3-4 mm gerisinden pars plana'dan vitreus boşluğuna doğrudan yapılan enjeksiyonlardır (Şekil 2.12.) (222). Gözün tüm bariyerleri geçilerek doğrudan intravitreal alana uygulandığı için en yüksek vitreus ilaç konsantrasyonunun sağlandığı uygulamalardır (6).

Göz hastalıklarının tedavisinde intravitreal enjeksiyon kullanımı son 15 yıldır yaygınlık kazanmıştır (220). Bununla birlikte, intravitreal uygulama ile ilgili ilk çalışmalar bir asırdan daha uzun bir zaman öncesine dayanır. İntravitreal enjeksiyonlar ilk olarak 1911 yılında, retina dekolmanının tedavisi için göz içine hava verilmesi için uygulanmıştır. 1940 yılında, endoftalmi tedavisinde özellikle penisilin grubuna ait antibiyotiklerin intravitreal kullanımı ile ilgili çalışmalar yayımlanmıştır (222-224). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) onaylı ilk intravitreal ilaç fomivirsen etkin maddesini içeren Vitravene® (Novartis, Basel, Switzerland)'dir (225). 1998 yılında onay alan bu ilaç, sadece antiviral etkinliği olduğundan dünyada hiçbir zaman yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. 2000'li yılların başında, steroidlerin maküler ödem tedavisindeki etkinliğinin gösterilmesi ile birlikte, intravitreal kortikosteroidin göz kliniklerinde kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu tarihten itibaren intravitreal tedavilerin, hastalığın ilerlemesini durdurarak görme düzeyi ve yaşam kalitesi üzerindeki olumlu etkilerinin gösterilmesi, tüm dünyada intravitreal enjeksiyonların kullanımını çok hızlı bir şekilde arttırmıştır. Anti-VEGF etkili ilaçların yaşa bağlı maküla dejenerasyonu tedavisinde etkili olduğunun bildirilmesi ile birlikte, intravitreal enjeksiyon uygulamalarının sayısı dramatik bir artış göstermiştir. 2000-2002 yıllarında Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık intravitreal uygulama sayısı 3500-4000 arasında değişirken, 2016 yılında yıllık 6 milyona ulaşmıştır. Dünyadaki kullanımı da dikkate alındığında intravitreal uygulama sayısı günümüzde çok daha fazladır. 2018 yılında yapılan bir araştırmaya göre, intravitreal enjeksiyonlar tüm dünyada göz hastalıklarının tedavisinde kullanılan en yaygın uygulamalardır (220). YBMD, DRP, üveitler ve ven dal tıkanıklığına bağlı maküler ödem, miyopik koroidal neovasküler membran gibi hastalıkların tedavisinde endikasyonu olan tüm farmasötik ajanlar, intravitreal enjeksiyon yolu ile uygulanır. (226, 227).

2.7. Diyabetik Retinopati Tedavisinde Kullanılan Tedavi Seçeneklerinin Kısıtlılıkları

Diyabetik maküler ödem tedavisinde intravitreal anti-VEGF etkili ilaçların, klinik kullanıma girmesi bu alanda bir devrim olarak tanımlanabilir. Anti-VEGF etkili ilaçların kullanıma girmesinden önceki dönemde kullanılan tedavi yöntemlerinde en önemli hedef hastanın o anda varolan görme düzeyinin korunması iken anti-VEGF etkili ilaçlarla birlikte hastanın, hastalık öncesi görme düzeyini tekrar kazanması gündeme gelmiştir (228). Anatomik iyileşme için de benzer durum sözkonusudur. İntravitreal tedaviler, hastalarda hem anlamlı düzeyde görme artışı hem de maküla anatomisinde düzelme sağlamaktadır (2, 203, 207). Yüksek etkinliklerinin yanında DMÖ tedavisinde kullanılan intravitreal tedavilerin ciddi kısıtlamaları da mevcuttur. Bu kısıtlamalar, intravitreal tedavilerin klinik pratikte hedeflenen düzeyde uygulanamamasına sebep olmaktadır. DMÖ ve diğer arka segment hastalıklarında intravitreal enjeksiyon tedavisinin uzun süreli takip sonuçlarının bildirildiği gerçek yaşam verilerinde bildirilen sonuçlar, prospektif kontrollü randomize çalışmalardan (RCT) çok farklıdır (228). Gerçek yaşam verilerinde, hem hastaların tedavi şemasına uyumu hem de tedavi sonucunda görme düzeylerinde elde edilen artış düzeyi çok düşüktür (229, 230). RISE ve RIDE çalışmasında yıllık 12 enjeksiyon yapılan hastalarda 9-12 harf görme artışı bildirilmiştir (2). Gerçek yaşam verilerinde anti-VEGF etkili ilaçların tedavide kullanımı ile elde edilen görme artışı ise 4-5 harf arasında bildirilmektedir (229, 230). Literatürdeki çalışmaların büyük bir çoğunluğu benzer sonuçlar bildirmektedir. Bu sonuçlar, gerçek yaşamda, RCT'lerin önerdiği aylık intravitreal enjeksiyon gerektiren tedavi şemalarının gerçek yaşamda uygulanabilirliğinin çok az olduğunu, bunun da tedavi sonrası elde edilmesi hedeflenen görsel artışı anlamlı olarak azalttığını göstermektedir (228). Gerçek yaşam verileri ile RCT sonuçları arasındaki farklılık ekonomik, sosyal veya teknik pek çok sebepten kaynaklanabilir. Çalışma hastalarının önceden belli kriterleri taşıyan ve çalışmaya devam etme taahhüdü alınan hastalar arasından seçilmesi, hastanın ek hastalıkları, yaş, ırk, cinsiyet gibi pek çok etken bu farklılığa sebep olabilir. Bu farklılıkların sebepleri incelendiğinde, hastaların intravitreal tedaviye uyumsuzluğunun çok önemli bir faktör olduğu görülmektedir. İntravitreal tedavi alan

hastaların tedaviye uyumsuzluğunu ve devamsızlığını inceleyen pek çok çalışmada, hastaların çok büyük bir kısmının tedavi planına uymadığı belirlenmiştir (231). Hastaların tedaviye uyumsuzluk sebepleri incelendiğinde, intravitreal uygulamadan kaynaklanan teknik zorlukların ve kısıtlılıklarının hastaların tedaviye uyumunu zorlaştırdığı görülmektedir (232). Güncel intravitreal tedavilerin kısıtllamaları şöyle özetlenebilir (231):

1. İnvitreal tedavilerle sağlanan iyileşmenin kalıcı olmaması, anatomik ve görsel iyileşme bulgularının devamı için aylık intravitreal enjeksiyonların gerekli olması
2. İnvitreal enjeksiyonlara ve etkin maddelere bağlı gelişebilecek ciddi yan etkiler
3. Hastaların %50'sine yakın oranda bildirilen tedaviye cevapsızlık
4. İnvitreal tedavilerin yüksek maliyeti
5. İnvitreal enjeksiyonlarının uygulanabilmesi için altyapı ve ekipman ihtiyacı
6. İnvitreal enjeksiyonların hastalar açısından rahatsız edici ve invaziv bulunması
7. Aylık uygulanan intravitreal enjeksiyon tedavi planlarının hastalar için uyumu zor tedavi şemaları olması

İnvitreal enjeksiyonların sağladığı anatomik ve görsel başarı kalıcı olmayıp sadece semptomların düzeltilmesine yöneliktir. Anatomik düzelme ve görme düzeyindeki artış, intravitreal ajanların, gözde etkin konsantrasyonda var oldukları sürece sağlanabilmektedir. Bunun en önemli nedeni, hastalıkların sistemik ve kronik doğasıdır. Diyabetik retinopati, sistemik hipergliseminin retina dokusunda oluşturduğu bulgular nedeniyle geliştiğinden, diyabet sürdüğü sürece retinopati riski de devam etmektedir. Bu nedenle ilaçların etkinliği gözdeki etkin konsantrasyon sağlanabildiği sürece sağlanabilmektedir. Gözde minimum etkin konsantrasyon

düştüğünde, gözdeki terapötik etki kaybolmakta ve maküler ödem tekrar açığa çıkmaktadır (233). Bu durum, vitreustaki etkin madde konsantrasyonunun sağlanması ve gözdeki tedavi edici etkinin sürdürülebilmesi için sürekli intravitreal enjeksiyon yapılmasını gerekli kılmaktadır. İntravitreal enjeksiyonlar sonrası retinada atrofi, katarakt, glokom gibi etkin maddelerin sebep olduğu yan etkilerin yanı sıra, endoftalmi, retina dekolmanı gibi intravitreal enjeksiyona bağlı ciddi yan etkiler de gelişebilmektedir (186, 187). Bu yan etkilerin gelişme riski uygulama sıklığı arttıkça artmaktadır (193). Hastalarda görülebilen iki önemli istenmeyen etki, tedaviye bağlı retinal atrofi gelişebilmesi ve %50'ye varan olgularda tedavi sonrasında hiçbir iyileşme etkisinin görülmemesidir (202, 204, 207). İntravitreal enjeksiyonlar, ameliyathane şartlarında steril ortamlarda ve göz uzmanları tarafından uygulanması gereken uygulamalardır. Buna bir de ilaçların yüksek maliyeti eklendiğinde, her bir intravitreal uygulama için gerekli olan maliyet artmaktadır (232). Bunun yanında hasta için tedirginlik verici bir uygulama olması hasta uyuncunun azalmasına sebep olmaktadır. Tüm bu kısıtlamalar sebebiyle, intravitreal enjeksiyonlar önerilen tedavi şemalarına göre çok daha az sıklıkta yapılabilmektedir ve buna bağlı olarak elde edilen tedavi başarısı düşmektedir (228).

2.8. Diyabetik Retinopati Tedavisinde Karşılaşılan Sorunlara Yönelik Çözüm Önerileri

Intravitreal uygulamalar konusundaki veriler dikkatle incelendiğinde, tüm ciddi kısıtlamalarına rağmen intravitreal enjeksiyonlar, yüksek göz içi ilaç konsantrasyonu sağlanması sebebiyle şu anda arka segment hastalıklarındaki en etkin ilaç uygulama yöntemidir (221, 233). Sorunların çözümüne yönelik olarak yeni etkin maddelerin tedavide kullanımı ve intravitreal uygulanan ilaçların vitreusta kalış süresini uzatarak enjeksiyon sıklığını azaltmak önemli bir çözüm yoludur (16). Tedavide etkinliği gösterilmiş ajanların, gözde etkisinin uzatılarak, daha az enjeksiyonla aynı etkinin sağlanmasına imkan verecek oküler salım sistemlerinin geliştirilmesi, oküler ilaç teknolojisi alanında çok önemli bir hedef olarak açığa çıkmaktadır (20). Etkin maddenin posterior segmente etkin bir şekilde taşınmasını sağlayarak, kontrollü ilaç salımı yapacak yeni ve özgün intravitreal ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi konusunda büyük bir ihtiyaç vardır (234). Bu durum

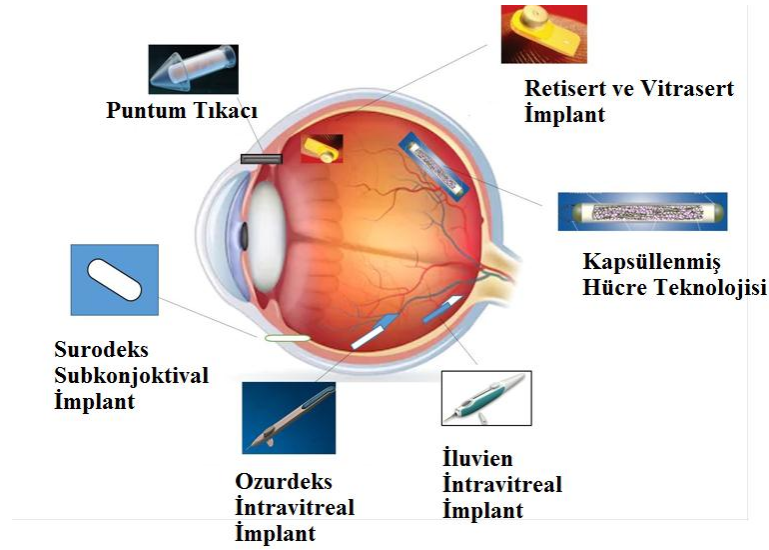
farmasötik teknoloji alanında intravitreal uygulamalara yönelik kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi için çok yoğun çalışmaların yapılmasına sebep olmaktadır (221, 234).

2.9. İntravitreal İlaç Taşıma Sistemleri

Kontrollü/uzatılmış salım sağlayan ilaç sistemlerinde, ilaç dozaj şeklinden belirli bir hız ile salınır ve ilacın tamamının salınması konvansiyonel dozaj şekillerine göre çok daha uzun sürmektedir. Bu sistemler, ilacın hedeflenen salım hızı ve süresi ürün geliştirme aşamasında belirlenerek tasarlanmaktadır. Tasarlanan ilaç sistemleri, ilacı kontrollü bir şekilde serbest hale geçirir ve hedef dokularda istenen terapötik ilaç konsantrasyonunun uzun süre devamını sağlar.

Son yirmi yıldır, kronik posterior segment hastalıklarının tedavisine yönelik intravitreal ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi konusunda çok yoğun çalışmalar yapılmıştır (221, 234). İntravitreal ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde ilk hedefler, hedef dokuda istenen ilaç salımının uzun süre sağlanması, buna bağlı olarak intravitreal enjeksiyon sayısının azalması, statik ve dinamik engellerin aşılması hedef dokuda terapötik ilaç dozunun yakalanmasıdır (9, 235). Bunlara ek olarak oküler dokularda toksik veya immünolojik bir cevaba sebep olmaması gerekmektedir (7, 236). Bu kapsamda implantlar ve nanotaşıyıcı sistemler en çok çalışılan sistemlerdir (16, 237). Göz hastalıklarının tedavisinde hem ön segment hem de arka segment hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere farklı oküler implantlar geliştirilmiştir (Şekil 2.12) (9).

Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri de, sağladığı üstünlüklerle, posterior segmente ilaç taşınımı konusundaki sorunları çözme konusunda çok önemli bir adaydır (9, 17, 221, 234, 235).



Şekil 2.12. Ön ve arka segmente uygulanan oküler implantlar (9).

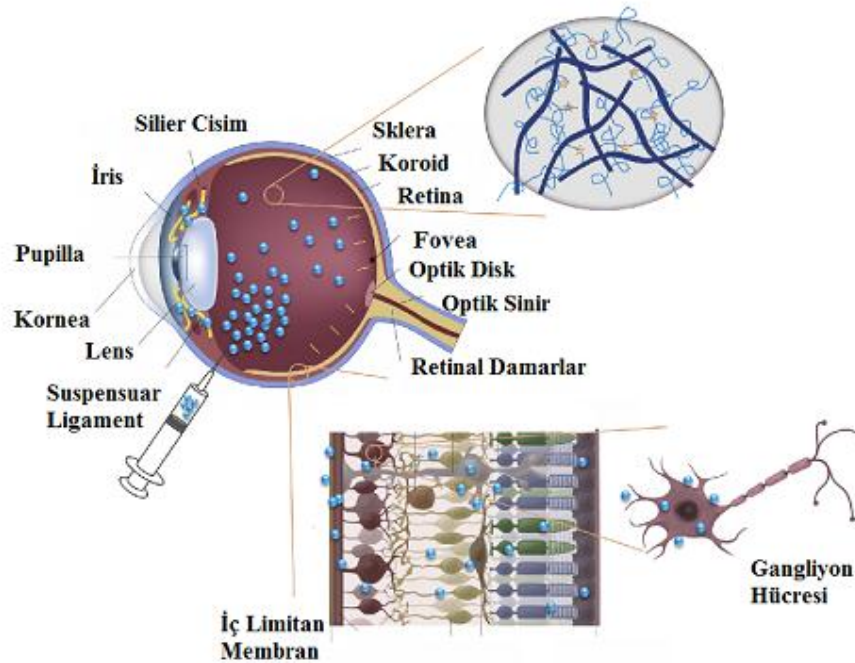
2.10. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaçların nanopartiküllere yüklenmesi, çözünürlük, stabilite, engelleri aşabilme, uygulama alanında uzun süre kalabilme ve uzun süreli salım gibi biyofarmasötik özellikleri olumlu anlamda geliştirmektedir (17). Atomların ve makroskopik malzemelerin aksine, nanomalzemelerin iç ve dış yüzey alanının hacme oranı yüksektir, bu da farklı ilaçları taşımak ve hedefleme grubunu takmak için uygun adaylar olmalarını sağlar (237). Ayrıca, farklı nanopartiküller çok çeşitli boyutlara, şekillere ve yüzey kimyasal özelliklerine sahip olacak şekilde tasarlanabilir (238). Bu nedenlerle, son yıllarda onkoloji, kardiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, göz hastalıkları ve genetik tedavi uygulamaları gibi pek çok alanda kullanılmak üzere nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir.

2.10.1. İntravitreal Uygulamaya Yönelik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, intravitreal enjeksiyonların etkinliğinin iyileştirilmesi, hastanın tedaviye uyuncunun arttırılmasına imkan sağlayabilecek hızla gelişen bir alandır. Bir oftalmik ajanın nanopartiküllere yüklenmesi sayesinde suda az çözünen ilaçların çözünürlüğünü arttırmak, ilacı retina hedeflemek, ilacın hücresel alımını arttırmak, ilacın biyolojik bariyerlerden taşınmasına yardımcı olmak, vitreusta kalma süresini

artırmak ve ilacı bozulmadan korumak mümkün olabilmektedir (14, 17). Bu üstünlükler, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile retinaya uygulanacak ilaçların sürekli ve kontrollü bir hızda salınmasını sağlamak ve invaziv olmayan bir sistem tasarlamak için önemli bir platform sunmaktadır (17). Son yıllarda ilaç taşıyıcı sistemler ve malzeme bilimi alanındaki dikkat çekici gelişmeler çok fazla nanomalzemenin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu amaçla oküler ilaç taşınımında, ilaçların nanopartiküllere yüklenmesi, yaygın olarak çalışılan bir konudur (9, 17, 221, 234, 235). Göz hastalıklarına yönelik olarak geliştirilen nanoterapötiklerin, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olması, göz içinde stabilitesini devam ettirebilmesi, biyouyumlu materyal özelliklerinde olması ve biyobozunur olması tercih edilmektedir (219). Bu amaçla, polimerik nanopartiküller başta olmak üzere, lipozomlar, katı lipid nanopartiküller, miseller, dendrimerler ve daha pek çok farklı nanopartiküler sistemler çalışılmaktadır (7, 215). Bu sistemler intravitreal olarak uygulandığında, ilacın yavaş ve kontrollü bir şekilde salınımlı sağlanarak vitreusta hedef terapötik dozun daha uzun süre korunması sağlanmaktadır (Şekil 2.13.) (234). Bu sayede intravitreal enjeksiyon sayısını azaltmaktadır (235).



Şekil 2.13. İntravitreal uygulanan nanopartiküllerin oküler dağılımı (240).

2.10.2. İntravitreal Uygulamaya Yönelik İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler

Göze uygulanacak taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde biyobozunur ve biyobozunur olmayan pek çok farklı polimer kullanılmaktadır (10). Biyobozunur polimerler, cerrahi olarak geri alınma işlemi gerektirmediğinden daha çok tercih edilmektedir (241). Gözde en sık kullanılan biyobozunur polimerler, poli(laktik-koglikolik asid) (PLGA), polilaktikasit (PLA), kitosan, siklodekstrinler ve polihidroksibütirat (PHBV)'tır (235, 239). Bu polimerlerden PLGA ve siklodekstrinlerin göz ilaçlarında kullanımı için FDA onayı mevcuttur (10). En sık kullanılan biyobozunur olmayan polimerler, silikon, polivinil alkol (PVA) ve PLGA, PLA, kitosan, siklodekstrinler vinil asetat (EVA)'dır (242).

• Siklodekstrinler (CD)

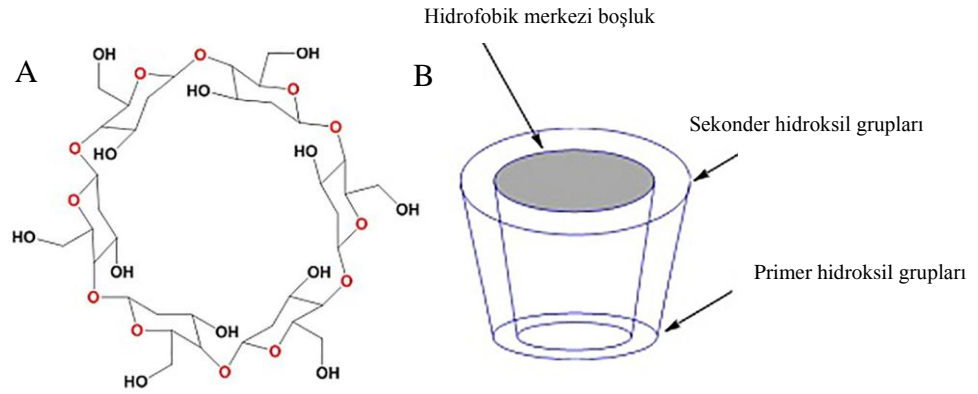
CD'ler, nişastanın siklodekstrin amilaz ve glikozil transferaz (CGTase) tarafından enzimatik parçalanmasıyla oluşan siklik yapıda homolog oligosakkaridlerdir. En çok bilinen üç üyesi 6, 7 and 8 glikopiranoz ünitesi, içeren α -CD, β -CD ve γ -CD'dir (Tablo 2.1.) (243).

Tablo 2.1. Doğal siklodekstrinlerin yapısı (244).

Siklodektrinin özellikleri	Siklodektrin tipi		
	α -CD	β -CD	γ -CD
Glikoz ünitesi	6	7	8
Bağ	α (1 \rightarrow 4)	α (1 \rightarrow 4)	α (1 \rightarrow 4)
Merkezi boşluğun boyutu (nm)	0,47	60	75
Halka yüksekliği(nm)	0,79	0,79	0,79

CD:Siklodekstrin

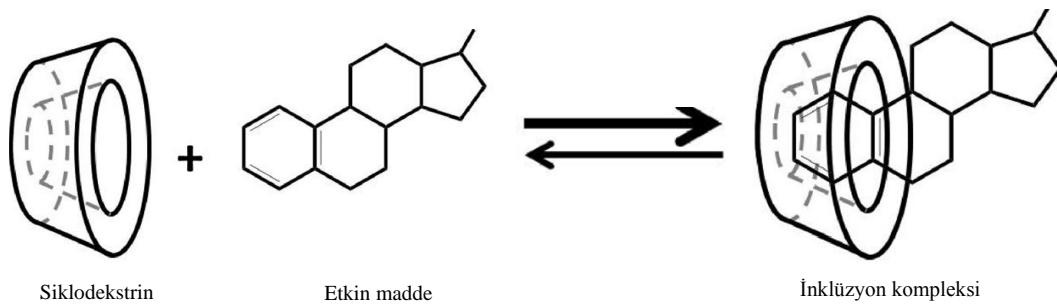
Glikopiranoz üniteleri arasındaki bağların etrafında dönüş olmadığından, CD'ler tam bir silindir değil koni şeklindedir. CD halkası, amfilik yapıda konik bir silindir özelliğindedir, hidroksil alt gruplarının oluşturduğu dış tabaka hidrofilik özellikte, merkezde yer alan boşluk ise lipofilik özelliktedir (Şekil 2.14.) (245).



Şekil 2.14.Siklodekstrinin kimyasal yapısı (A) ve moleküler şekli (B) (246).

Halka yapısındaki molekülün pek çok hidroksil alt grubu vardır. Bu grupların hepsinin halkanın dış yüzünde yer alması sebebiyle, yapı çok güçlü hidrofilik bir özelliğe sahiptir. Öte yandan glikozidik oksijen bağları nedeniyle içteki boşluk daha az hidrofildir (245). Bu özellik, CD'lerin düşük çözünürlüğe sahip organik ve inorganik tuzlar ve nötral molekülleri iç boşlukta hapsederek bir inklüzyon kompleksi oluşturmasına sebep olur (245). CD'ler bu sayede pek çok ilaç için çözünürlük artırıcı ekspan olarak kullanılmaktadır (247). Yüklenmesi hedeflenen ilaç molekülünün boyutu ve geometrisi önemlidir (248). β -CD'in ilaç hapsedeceği merkezdeki boşluk alanı 0,60 nm yüksekliği 0,79 nm'dir (Tablo 2.1.). Hapsedilecek ilacın yüksekliğine göre, bazen aynı boşluğu 2 tane ilaç molekülü hapsedilebilir (Şekil 2.15.) (248).

CD'ler, FDA'nin listesinde inaktif farmasötik bileşen olarak tanımlanmıştır (249). α -CD ve β -CD'ler oral ve intravenöz, γ -CD sadece topikal uygulamalar için maksimum %1,5 (w/v) oranında kullanılmak koşuluyla formülasyonlarda yer alır (249).



Şekil 2.15. İnküzyon kompleksi oluşumu (250).

CD'ler, zayıf çözünürlüğe sahip etken maddelerle hidrofilik inklüzyon kompleksleri oluşturarak etken maddenin çözünürlüğünü artırır, bu nedenle pazardaki birçok ilaçta eksipiyen olarak bulunurlar (253). CD'ler bu özellikleri sebebiyle ilaç moleküllerinin çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını arttırmak için çok yaygın olarak kullanılmaktadır (247). CD'ler oral, parenteral, nazal, pulmoner formülasyonlarda yaygın olarak uygulanmaktadır (251). Ayrıca son dönemde pek çok CD, CD türevleri nanopartiküler bazlı sistemlerde nanotaşıyıcı olarak tercih edilmektedir (251-253).

- **CD Türevleri**

CD'lerin çözünürlüklerinin artırılması ve toksisitelerinin azaltılması amacıyla HP- β -CD (2 hidroksi propil β -CD), SBE- β -CD (sülfobütiler CD- sodyum), TM- β -CD (trimetil CD), DM- β -CD (dimetil β -CD) ve HP- γ -CD (hidoksi propil γ -CD) gibi bazı türevleri geliştirilmiştir. Hem doğal CD'ler hem de CD türevleri farmasötik teknoloji alanında çok yaygın olarak kullanılmaktadır (243, 246-250).

- **2-Hidroksipropil-Beta-Siklodekstrin (HP- β -CD)**

2-Hidroksipropil-beta-siklodekstrin (HP- β -CD), siklik oligosakkaridlerin farmasötik alanda en yaygın olarak kullanılan üyesidir. İlk olarak 1893 yılında farmasötik formülasyon olarak patent almış, ondan sonra bu alanda kullanımı büyük bir hızla artmıştır (251-253, 254). 2-Hidroksipropil-beta-siklodekstrin, pek çok farmasötik üründe eksipiyen olarak kullanılmaktadır. Eksipiyen özelliğine ek olarak etkin madde özeliği de vardır. Nadir bir lizozomal depo hastalığı olan Neimann Pick hastalığında tedavi edici özeliği gösterilmiştir (255). Bu anlamda yetim ilaç (EU/3/11/895) statüsündedir (256). Bu özeliğinin yanında, HP- β -CD düşük çözünürlüğe sahip pek çok etken maddenin intravenöz, oftalmik, intratekal ve oral kullanıma yönelik çözelti formlarının geliştirilmesinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (244, 247, 252-254). Göz hastalıklarının tedavisinde de CD yüklenmiş pek çok etken madde ile yapılmış çalışma bulunmaktadır (251, 252, 257).

- **Oftalmik İlaçlarda CD'lerin Kullanımı**

CD'ler klinikte kullanılan pek çok göz ilacının klinik etkinliğinin artırılmasında yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu amaçla hem doğal siklodekstrinler (α , β , γ), hem de türevleri (HP- β -CD, SBE- β -CD, TM- β -CD, DM- β -CD and HP- γ -CD) ilaç-CD inklüzyon kompleksi oluşturmak için kullanılmaktadır. CD türevleri arasında, ilaçların çözünürlüğünü ve dayanıklılığını arttırmak, oküler irritasyonu azaltmak amacıyla en sık tercihen CD türevi HP- β -CD'dir (250, 251). CD-ilaç kompleksinin, dorzolamid, deksametazon, indometazin, ekonazol nitrate ve siklosporin A gibi farklı kategorilere ait ilaç moleküllerinin biyoyararlanımını artırarak klinik etkinliği, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu, korneal inflamasyon, glokom gibi pek çok hastalıkta etkinliği arttırdıkları gösterilmiştir (252). Oküler ilaç taşınımı için için siklodekstrin içeren formülasyon örnekleri Tablo 2.2'de sunulmuştur (252). İlaç CD kompleksleri, göz dokularına daha fazla miktarda ilaç taşınmasını sağlayarak lokal ve sistemik oftalmik hastalıkların tedavisinde önemli katkı yapmaktadır (226).

Tablo 2.2. Oküler ilaç taşınımı için için siklodekstrin içeren formülasyon örnekleri (252)

İlaç	Sikodekstrin (*)
Asetazolamid	β CD, TM β CD, DM β CD, HP β CD
Asiklovir	HP- β -CD
Siklosporin A	α CD, γ CD
Dekzamekazon	HP β CD
Diklofenak	HP β CD,
Dorzolamid	γ CD
Ekonazol	M β CD, HP β CD, SBE β CD
Flusinolone asetonid	HP β CD
Hydrokörtizon	γ CD
İndometazin	β CD, HP β CD, SBE β CD
Latanoprost	α CD, β CD, γ CD, HP β CD,
Pilokarpine	α CD, HP β CD
Vorikonazole	HP β CD

* α CD(Alfa CD), Bcd (beta CD) γ CD (Gama CD), HP- β -CD(2 hidroksi propil β -CD), SBE- β -CD(sülfobütileter CD- sodyum), TM- β -CD(trimetil CD), DM- β -CD(dimetil β -CD)

Piyasada kullanılmakta olan iki oftalmik ilacın yapısında çözünürlük artırıcı olarak CD- türevleri kullanılmıştır. İndometazin içeren İndosit'in bileşiminde HP- β -CD, diklofenak sodyum içeren Voltranen Ophtha'nın içinde ise HP- γ -CD bulunmaktadır (256, 257).

CD ilaç kompleksleri hem geleneksel dozaj şekillerinde hem de nanopartikül, nanolipozom, nanosfer, nanojel, *in situ* jeller gibi ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır (258). Dorzolamid, deksametazon, indometazin, ekonazol nitrate, siklosporin A ve imidazol gibi pek çok oftalmik ilacın çözünürlüğünü ve

biyoararlanımını arttırmak için, CD bazlı nanopartiküler sistemi geliştirilmiştir (259, 260).

Son yıllarda CD'lerin, oftalmik nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesinde kullanımı giderek yaygınlık kazanmaktadır (261). CD'ler, özellikle nanopartiküllerdeki düşük ilaç yükleme kapasitesinin üstesinden gelmekte faydalı olmaktadır. Buna ek olarak, CD bazlı NP sistemlerinde siklodektrinin sağladığı yüksek çözünürlük, doku irritasyonunda azalma ve nanopartikül stabilizasyonunda artış diğer önemli üstünlükleridir.

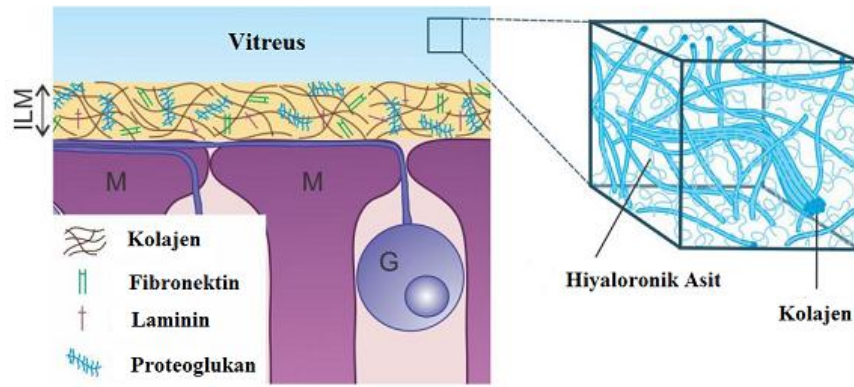
- **Polihidroksi bütirat 3 -hidroksi valerat (PHBV)**

Polyester ailesinin bir üyesi olan ve prokaryotların enerji depoladığı makromoleküller olan polihidroksialkonatlar (PHA), ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde çok yaygın olarak tercih edilen biyobozunur ve biyouyumlu biyomateryallerdir (262, 263). Açlık koşullarında yüzden fazla mikroorganizma, PHA biriktirebilir (264, 265). Bu biriken PHA, bir çözücü kullanılarak ekstre edilir ve pek çok farklı yöntem aracılığı ile çöktürülür (266). Doğal kaynaklar tarafından üretilmesi, termoplastisitesi, biyouyumluluk ve biyobozunurluk özellikleri sebebiyle PHA'lar, biyomedikal sektör başta olmak üzere pek çok sektör için çok geniş uygulama alanı olan malzemelerdir (267). PHBV, PHA ailesine ait, doğrusal yapıda bir alifatik polyesterdir (268). PHBV, farklı molar konsantrasyonlarda hidroksibütirat (HB) ve hidroksivalerattan (HV)'in oluşan bir kopolimer yapısındadır. PHBV'nin mekanik özellikleri modifiye edilebilir ve degradasyon ürünü olan 3 hidroksibütirik asit, insan kanında bulunabilen bir metabolittir (269). Bu özellikler PHBV'nin mikro ve nanotaşıyıcı sistemlerde ilaç taşıyıcı polimer olarak ve doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak çok yaygın olarak tercih edilmesine sebep olmaktadır (270, 271). Göze uygulanmak üzere geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde biyouyumlu, toksik olmayan ve biyobozunur bir polimer olan PHBV yaygın olarak kullanılmaktadır (212, 272, 273).

2.11. İntravitreal Uygulanan Nanopartiküllerin Dağılımı

İntravitreal uygulanan nanopartiküllerin, etki gösterebilmesi için retinaya ulaşması gerekmektedir (274). İntravitreal nanopartiküllerin, retina dokusuna ve subretinal alana ulaşması için üç bariyeri aşması gerekmektedir, bunlar vitreus, ILM ve nöral retina'dır. Her üç yapının da nanopartikül geçişini sınırlayan kendine has bariyer özellikleri mevcuttur. Ancak bu bariyer özelliklerini aşacak şekilde tasarlanmış nanopartiküller retina dokusuna ulaşabilirler.

Vitreus: İlacın intravitreal olarak uygulanmasından sonra hedef dokulara ulaşabilmesi için öncelikle vitreus içinde difüzyon yoluyla dağılması gerekmektedir. İlacın vitreus içindeki difüzyonu, statik ve dinamik pek çok faktör tarafından engellenir: Vitreusun anatomik özellikleri, statik bariyer özelliği gösterirken, konvektif akım ve vitreusun ilaçtan temizlenme mekanizmaları da dinamik bariyer görevi görür (275). Vitreus, tip II, tip IX ve tip V/X kollajenden oluşmuş, şeffaf jelimsi kıvamda bir dokudur (Şekil 2.16.). Yapısındaki yüksek su oranından dolayı (%98-99) yoğunluğu suya yakındır. Kollajenin çoğu (%65) tip II kolajendir. Yapısındaki yüksek kollajen oranı, uygulanan kuvvete karşı esnek ve güçlü olmasını sağlar. Kollajenlerin arasındaki boşluklar çoğunluğu hiyaloronik asitten (HA) oluşan glikozaminoglikanlar (GAG) tarafından doldurulur. Bu yapı, vitreustaki kollajen yapısını sağlamlaştırır ve şişme etkisi sağlar. GAG negatif yüklüdür. HA dışında, vitreusun yapısında kondroidin sülfat ve heparin sülfat bulunur. Vitreusun yapısı, homojen değildir, anatomik bölgelere göre farklılık gösterir. En büyük kısmı oluşturan merkezi vitreus, düşük kollajen içeren daha sıvı şekildedir. Retinaya komşu alanda yeralan kortikal vitreusta ise kollajen ve HA'in yoğun oranda yer aldığı daha sert ve güçlü bir vitreus yapısı bulunur. Yaşla vitreus yapısındaki kollajen azalır ve vitreus sıvılaşır. Bu süreç likefaksiyon olarak adlandırılır (275).



Şekil 2.16. İç limitan membran (ILM) ve vitreusun yapısının şematik gösterimi (276).

M:Müller Hücresi; G:Gangliyon Hücresi

Vitreusun jel kıvamındaki yapısı, nanopartiküllerin retinaya hızlı bir şekilde ulaşmasını engeller. Kollajen ve GAG'ın oluşturduğu ağ, 500-1000 nm boyutlarında porlara sahiptir (277).

Konveksiyon, silier proseslerde üretilen aköz sıvının bir kısmının vitreusun içine retinaya doğru geçmesidir. Bu hareketin sebebi retina ve ön segment arasındaki sıcaklık ve basınç farkıdır (221, 274). Vitreusta serbest hareket edebilen moleküller üzerinde daha az etkiliyken, büyük ve vitreustaki hareketleri sınırlı olan moleküller üzerinde daha fazla etkilidir (276).

İntravitreal uygulanan ilaç eliminasyonu, ön segmente geçerek, aköz hüme dolaşımı ve uveal kan akımı ile elimine edilebilir veya kan-retina bariyeri yoluyla koroidal dolaşıma iletilerek posterior olarak gerçekleştirilebilir (6). Anterior veya posterior yol ile eliminasyon ilacın fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Kan-retina bariyerinden geçirgenliği yüksek olan küçük ve lipofilik ilaçlar çoğunlukla posterior yoldan elimine edilirken, büyük ve hidrofilik ilaçların eliminasyonu anterior yoldan olur (201,256). Posterior yolla elimine olan ilaçların vitreusta yarı ömrü çok kısa olurken, anterior yolla elimine olan ilaçların nispeten daha uzundur (6,276).

ILM, kolajen, laminin ve fibronektin içeren, retina ile vitreus arasında yer alan tabakadır. Müller hücrelerinin bazal membranıdır ve bu hücrelerin ayakları (footplate) yapıları tarafından oluşturulur. Kalınlığı retinanın farklı bölgelerinde değişiklik

göstermekle birlikte yaklaşık 4 mikrondur. Vitreustaki nanopartiküllerin, retinaya geçişinde, ILM bariyer görevi görür (240). ILM'nin bariyer fonksiyonu molekülün büyüklüğüne, yüküne ve diğer özelliklerine göre değişebilir (277). Pozitif yüklü moleküllerin geçişi daha fazla engellenirken, nötral veya negatif yüklü moleküller daha kolay retinaya geçebilirler (6). Bununla birlikte, nanopartiküllerin ILM'den geçişinde, difüzyonun yanında clathrin proteinlerinin aracılık ettiği endositoz gibi farklı transport mekanizmaları da rol oynar (278, 279). Bu nedenle ILM'nin farklı özellikteki nanopartiküllere farklı geçirgenlik özelliğinin olduğu gösterilmiştir (280).

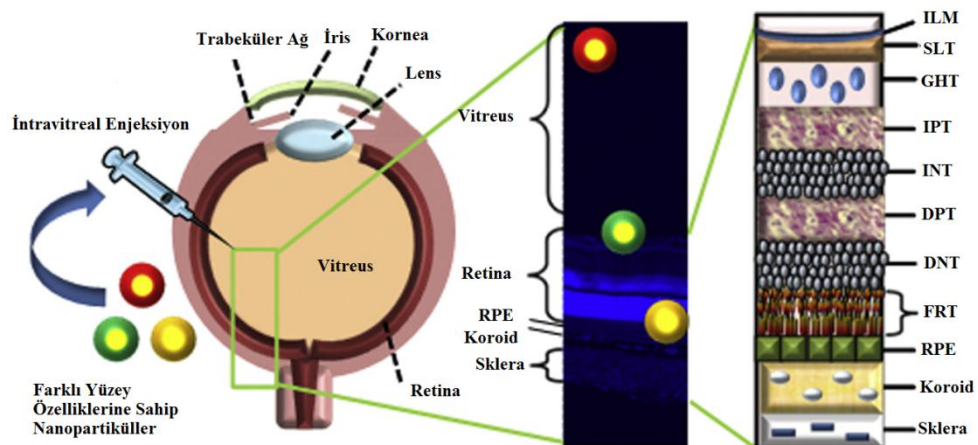
Nöral Retina: Nöral retina, fotoreseptörlerin, nöral ve glial hücrelerin oluşturduğu çok tabakalı bir nöral dokudur. Bu yoğun ve kompleks hücre organizasyonu sebebiyle moleküllerin difüzyonu engellenir. Özellikle farklı hücre tabakalarının sinapslarının oluşturduğu iç ve dış pleksiform tabakalar retina boyunca hücre difüzyonunu engelleyen en önemli tabakalardır (281). Ayrıca iç ve dış nükleer tabakalar da difüzyonu engelleyen diğer önemli yapılardır (282). Statik bariyerlere ek olarak retina dokusu boyunca madde geçişini engelleyen bir diğer faktör de retina dokusunun içeriğidir. Retinada, interfotoreseptör matriksin yapısında bulunan GAG'lar, ILM ve vitreusa benzer şekilde, retinada ilerleyen moleküllere bağlanabilir. Bu şekilde moleküllerin difüzyonuna ve ilerlemesine engel olabilir (283).

2.12. İntravitreal Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Özelliklerinin İntravitreal Dağılıma ve Hedef Dokuya Ulaşımında Etkileri

İntravitreal olarak uygulanan nanopartiküllerin retina dokusunda etkin ilaç konsantrasyonu sağlaması iki faktöre bağlıdır: Nanopartiküllerin vitreustaki dağılımı ve retina dokularına geçişi. Nanopartiküllerin vitreusta dağılımı, enjeksiyon alanındaki yüksek nanopartikül konsantrasyonundan diğer alanlardaki düşük nanopartikül konsantrasyonuna doğru konsantrasyon farkı eşitleninceye kadar difüzyon yoluyla gerçekleşir. ILM'ye ulaşan nanopartiküller, ILM'yi geçerek retinanın iç tabakalarına ilerlerler. Retina tabakalarını aşabilen nanopartiküller subretinal alana ve RPE'e ulaşır. Vitreustan retina dokusuna geçişte, Müller hücrelerinin de rol oynadığı gösterilmiştir (259). Nanopartikülün fizikokimyasal özelliklerinden, büyüklük ve yük, difüzyonu ve retina tabakalarına geçişi etkileyen en önemli faktörlerdir (240, 281).

Partikül büyüklüğü: Partikül büyüklüğü, nanopartikülün vitreustaki hareketini ve yarı ömrünü belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Nanopartikül boyutu konusunda kesin belirlenmiş sınırlar olmamakla birlikte, 1 mikronun üzerindeki nanopartiküllerin vitreus içindeki hareketinin, vitreusun yapısına bağlı olarak çok sınırlı olduğu belirtilmektedir (277). Öte yandan 500 nm'nin altındaki nanopartiküllerin vitreusta serbestçe hareket ettiği gösterilmiştir. İç limitan bariyerin aşılması ve retina tabakalarında ilerleme için de nanopartikül boyutu önemlidir. 200 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin ILM'yi aşarak, retina tabakalarında ilerlediği gösterilmiştir (278).

Partikül yükü: Vitreusun ve iç limitan membranın yükü nanopartiküllerin bu bariyerleri aşmasında belirleyici rol oynamaktadır (Şekil 2.17.). Özellikle 350 nm'den daha küçük nanopartiküllerin vitreusta dağılımı ve retinaya ulaşmasında temel belirleyici rolün partikül yükü olduğu gösterilmiştir (279). Vitreusun yapısındaki GAG'lar negatif yüklü olduğundan pozitif yüklü nanopartiküller GAG'lara yapışarak hareketleri engellenir. Bu nedenle negatif yüklü ve nötral nanopartiküllerin vitreusta difüzyonu ve hedef dokuya ilerlemesi daha kolaydır. İç limitan membrandan geçiş için de benzer özellikler geçerlidir. Katyonik özellikli nanopartiküller, vitreusu aşmayı başarabilseler dahi ILM'de birikirler ve retinanın iç tabakalarına geçemezler. Bu durum retinada etkin ilaç dozunun sağlanabilmesini engeller (279).



Şekil 2.17. İntravireal uygulanan nanopartiküllerin (aynı boyutta, farklı yüzey yüküne sahip) göz dokularında dağılımının şematik gösterimi (279).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (2HP- β -CD)	Sigma, ABD
70 kDa FITC konjuge edilmiş dekstran	Sigma, ABD
Amonyak	Carlo Erba, Fransa
Asetazolamid	Sigma, ABD
Diklorometan	Carlo Erba, Fransa
Etilen glikol diglisidil eter (EGDE)	Sigma, ABD
Fenilefrin hidroklorür damla	Sanovel, Türkiye
Fluoresein	Pharnagus, Türkiye
Gama siklodekstrin (γ CD)	Sigma, ABD
Hidroklorik asit	Carlo Erba, Fransa
Hidroksipropil metil selüloz (HPMC)	Sigma, ABD
Hücre kültür besiyeri	Cell System, ABD
İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı (HRMEC)	Cell System, ABD
İzoforon diizosiyanat	Sigma, ABD
İzopropanol	Merck, Almanya
Ketamin	Arion, Türkiye
Ksilazine	Bioveta, Çek Cumhuriyeti
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid)	Acros Organics, ABD
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (pH 7.4, Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)	Capricorne, Almanya
Polivinil alkol (PVA)	Sigma, ABD
Poly(3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat)	Sigma, ABD
Sodyum hidroksit	Carlo Erba, Fransa
Span-80	Fisher Bioreagents, ABD
Toluen	Isolab, Türkiye
Tropomid®	Bilim İlaç, İstanbul
Tween-20	Fisher Bioreagents, ABD
Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	R and D, ABD

3.2. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Alet ve Cihaz Adı	Marka ve Kaynak
96 kuyucuklu steril plaka	Jetbiofil, ABD
Biyogüvenlik kabini	Safe Fast Classic, İtalya
Distile su cihazı	Millipore, ABD
Enjektör (1 mL, 5 mL, 10 mL)	Genjekt, Türkiye
Enjektör ucu filtre 0,45 µm, steril, RC	Merck, Almanya
Etüv	MikroTest, Türkiye
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	Thermo Fisher Scientific, ABD
Fundus fluoro fotometri (FFFM)	OcuMetrics, Kanada
Fundus fluoresein anjiografi (FFA)	Phoenix ICON™, Pleasanton, USA
Hassas terazi	Shimatzu, Japonya
Hassas yüzey aşındırma ve kaplama sistemi	Pleasanton, ABD
Hücre kültür kapları (flask, 25 cm ²)	SPL Life Science, Kore
Hücre kültür plakaları (12 kuyucuklu)	Corning, Almanya
Hücre kültürü insertleri (0,4 µm)	Corning, Almanya
İnverted floresans mikroskop	Leica, Almanya
Karbondioksitli inkübatör	Panasonic, Japonya
Manyetik karıştırıcı	Daihan, Kore
Mikropipet (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf Research® Plus, Almanya
Mikropipet ucu	Tarsons, Hindistan
Mikroplaka okuyucu	ClarioStar, Almanya
Nanodrop	ClarioStar, Almanya
Optik koherens tomografi (OKT)	Envisu R2310; Biotigen, Wetzlar, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Polipropilen tüp, kapaklı (15 mL, 50 mL)	Tarsons, Hindistan
Retina lensi	Biotigen, Envisu, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya

Taramalı elektron mikroskopu (SEM)	Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya
Taşınabilir el biyomikroskobu	HawkEye, Dioptrix, Fransa
Tonometre	Tono-Pen AVIA Tonometre, ABD
Transepitelyal/endothelial elektriksel direnci (TEER) ölçüm cihazı	Volt/OhmMetre (EVOM2) Evom, WPI, ABD
Türbidimetre cihazı	Lovibond, Almanya
Ultrasonik homojenizatör	Bandelin, Almanya
Ultrasonik su banyosu	Bandelin, Almanya
Vorteks	MRC, İsrail
Zetasizer	Malvern Instruments, İngiltere
Zetasizer yük küveti	Malvern Instruments, İngiltere

3.3. Deney Hayvan

Tür	Kaynak	Barınma, Deney
Yeni Zelanda	Ankara Hastanesi	Ankara Hastanesi
(Dişi, beyaz)	Deney Hayvanları Laboratuvarı	Deney Hayvanları Laboratuvarı

3.4. Analitik Yöntem Geliştirilmesi ve Validasyonu

Nanopartikül yükleme ve salım çalışmalarından elde edilen numunelerdeki asetazolamid miktarını tayin etmek amacıyla UV spektrofotometrik bir yöntem geliştirilerek valide edilmiştir.

3.4.1. Asetazolamid için Miktar Tayini Yöntemi

Asetazolamid'in tez kapsamında yapılan çalışmalardan elde edilen numunelerdeki miktarı, çok küçük hacimdeki örneklerin UV spektroskopik analizi için

kullanılan bir cihaz olan nanodrop kullanılarak tayin edilmiştir. 0,5 mg ACZ 0,1M amonyum hidroksit (NH₄OH)/PBS içerisinde çözündürüldükten sonra 200-1000 nm dalga boyları aralığında nanodrop vasıtasıyla UV spektrumu alınarak maksimum absorbans verdiği dalga boyu ($\lambda_{maks}=294$ nm) belirlenmiştir. Nanopartikül yükleme ve salım çalışmalarından elde edilen numunelerdeki ACZ miktarı 294 nm dalga boyunda tayin edilmiştir.

3.4.2. Analitik Yöntemin Validasyonu

Etkin madde miktarını tayin etmek amacıyla geliştirilen analitik yöntem, nanopartikül yükleme ve salım çalışmalarından elde edilen numunelerdeki ACZ miktarını tayin etmek için uygun bir yöntem olduğunu kanıtlamak amacıyla valide edilmiştir (264). Analitik yöntemin validasyonu amacıyla validasyon parametreleri arasından doğrusallık (*linearity*), doğruluk (*accuracy*), kesinlik (*precision*), dayanıklılık (*stability*) ve özgüllük (*specificity*) parametreleri incelenmiştir.

- **Doğrusallık (*Linearity*)**

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, belirlenen konsantrasyon aralığında etkin madde konsantrasyonu ile absorbans değerleri arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı esasına dayanmaktadır. Miktar tayini yönteminin doğrusallığını göstermek amacıyla, 0,5mg ACZ 1000 μ L 0,1M NH₄OH içeren çözünme ortamında çözülerek 0,5mg/mL konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden seri seyreltmeler ile 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda ACZ içeren standart çözeltiler hazırlanarak (n=3) 294 nm'de absorbansları ölçülmüş, kalibrasyon doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R²) hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü hesaplanmış ve ölçülen absorbans değerlerinin güven aralığındaki durumu değerlendirilmiştir.

- **Doğruluk (*Accuracy*)**

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen sonuçların gerçek değerlere yakınlığını gösteren bir validasyon parametresidir. Analitik yönteminin

doğruluğunu göstermek amacıyla kalibrasyon doğrusu üzerinde düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,0156; 0,125; 0,5 mg/mL) üç farklı seri ACZ çözeltileri hazırlanarak 294 nm'de absorbansları tayin edilmiştir. Elde edilen değerlerin %Bağıl Hata ve Geri Kazanımları Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'ye göre hesaplanarak yöntemin doğruluğu gösterilmiştir. Tayin edilen Bağıl Hata (%) %2'den düşük olmalıdır.

$$\% \text{ Bağıl Hata} = (A - B) / Y \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

$$\% \text{ Geri Kazanım} = A / B \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2})$$

A= Ölçülen konsantrasyon

B= Eklenen konsantrasyon

- **Kesinlik (*Precision*)**

Analitik yöntemin kesinliği, aynı şartlarda ve aynı yöntem ile elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını göstermek amacıyla kullanılan bir validasyon parametresidir. Analitik yöntemin günler arası ve gün içi kesinliğini göstermek amacıyla üç farklı günde kalibrasyon doğrusu üzerinde düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,0156; 0,125; 0,5 mg/mL) üç farklı seri ACZ çözeltileri hazırlanarak 294 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçların % Bağıl Standart Sapmasının (Eşitlik 3) %2'den düşük olması analitik yöntemin kesinliğinin göstergesi olarak alınmıştır.

$$\% \text{ Bağıl Standart Sapma} = \text{Standart Sapma} \times 100 / \text{Ortalama} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

- **Özgüllük (*Specificity*)**

Bir analitik yöntemin özgüllüğü, numune içerisindeki diğer bileşenlerin varlığında sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğidir. Yöntemin etkin maddeye özgüllüğünü göstermek amacıyla, etkin madde içermeyen

salım ortamı ve nanopartikülün hazırlandığı polimeri içeren salım ortamının stok çözeltisi hazırlanarak absorbans taraması yapılmış ve maksimum absorbans verdiği dalga boyları tayin edilerek karşılaştırılmıştır.

- **Dayanıklılık (*Stability*)**

Etkin maddenin stabilitesinin (beklemeye karşı değişimi) gösterilmesi için analitik yöntemlerin kararlılık analizlerinin de yapılması gerekir. Bu amaçla kalibrasyon doğrusu üzerinde düşük, orta ve yüksek olmak üzere ACZ'nin çözünme ortamında üç farklı konsantrasyonda (0,0156; 0,125; 0,5 mg/mL) üç farklı seri çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları hazırlandığı anda, 6., 12., 24., 48., 72., 96. ve 112. saatlerde 294 nm'de ölçülerek, konsantrasyonlardaki değişim, zamanın fonksiyonu olarak incelenmiştir.

3.5. ACZ Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Çalışmalarının Yapılması

Tez çalışmaları kapsamında ACZ yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilerek karakterizasyon (Morfoloji-Taramalı elektron mikroskobu, Boyut ve yüzey yükü-Zeta Sizer, Fizikokimyasal özellikleri-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), salım ve degradasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. ACZ Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında iki farklı polimer kullanılarak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında polimer olarak PHBV ve CD kullanılmıştır. Posterior segmente ilaç taşınması amacıyla intravitreal uygulamaya yönelik olarak geliştirilen nanopartiküllerin partikül boyutunun 200-300 nm arasında ve yüzey yükünün negatif değerlerde olması tercih edilmektedir (6, 278, 279). Ayrıca vitreusta kalış süresi ve ilaç salım süresi nanopartiküler sistemin stabilitesi tarafından etkilendiği için hazırlanan sistemlerin stabilitesi dikkat edilmesi gereken bir diğer parametredir. Tez

çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartiküler formülasyonlar ve formülasyon bileşenleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

- **Polimer Seçimi**

Göze uygulanacak nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesinde polimer seçimi önemlidir. Bu amaçla kullanılacak polimerin inert, toksik olmayan ve immunolojik cevap oluşturmeyen, biyobozunur yapıda olması gerekmektedir (235).

- **ACZ yüklü Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat (PHBV) Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

ACZ yüklü PHBV nanopartikül (ACZ-PHBV-NP) formülasyonu (Tablo 3.1) çift emülsiyon (w1/O1/w2) çözücü-buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Bu amaçla PHBV (0,3 mg) içeren diklorometan (10 mL) çözeltisi organik faz olarak kullanılmıştır. ACZ (1M) NH₄OH içerisinde çözüldürüldükten sonra organik faza damla damla eklenmiş (4 mL), ultrasonik homojenizatörde 150 W güç çıkışı ile 180 saniye süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. ACZ içeren organik faz, aynı koşullar altında sulu bir PVA çözeltisine (40 mL) eklenmiştir. Elde edilen emülsiyon, 200 mL PVA çözeltisine ilave edildikten sonra diklorometanın tamamen uçmasını sağlamak için 6 saat boyunca 900 rpm’de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Asetazolamid içeren PHBV nanopartikülleri (ACZ-PHBV NP) 11.000 rpm’de 4°C’de 20 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant ACZ konsantrasyonunun tayin edilmesi için saklanmış, elde edilen pellet ise üç kez deiyonize suyla yıkanmıştır. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, sonraki analizler için +4°C’de saklanmıştır.

- **Siklodekstrin ve Asetazolamid Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

Siklodekstrin nanopartiküllerinin hazırlanmasında polimer konsantrasyonu, polimer/ilaç konsantrasyon oranı, çapraz bağlayıcı oranı gibi faktörler, partikül büyüklüğü, yüzey yükü, yükleme verimi ve nanopartiküllerden etkin maddenin

salımını ve buna bağılı olarak kullanım alanını etkilemektedir (259-261). Etkin madde yüklü CD nanopartiküllere ait literatür bilgisi taranarak, polimer/ilaa oranı ve diğer parametreler gözönünde bulundurularak 4 farklı yöntem kullanılmıştır (Tablo 3.1.) (285, 286).

o **Yöntem 1**

Bu yöntemde polimer olarak 2-hidroksipropil- β -siklodekstrin (2HP- β -CD) kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında, izoforon diizosiyanat (105 μ L) ve toluen (895 μ L) karışımı organik faz olarak kullanılmıştır. Su fazı olarak 2HP- β -CD (120 mg) ve Tween 20 (100 μ L) içeren distile su (10 mL) kullanılmıştır. Su fazı organik faza eklenerek 5 dk boyunca karıştırılmış (400 rpm), elde edilen emülsiyon Ultrasonikprob (20 kHz; output 200 W; Bandelin, Sonopuls HD 4200, Germany) ile 1dk süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. Elde edilen emülsiyon manyetik karıştırıcıda 400 rpm'de, 4 saat boyunca karıştırıldıktan sonra 11.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek nanopartiküller toplanmış ve distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, sonraki analizler için +4°C'de saklanmıştır.

o **Yöntem 2**

Bu yöntemde Span 80 (%1) içeren diklorometan, organik faz olarak kullanılmıştır. 2HP- β -CD (0,2 g) NaOH (0,2 M; 5 mL) içinde çözündürüldükten sonra çapraz bağlayıcı EGDE (2mL) eklenmiştir (sulu faz). Bu zelti manyetik karıştırıcı kullanarak 400 rpm'de 5 dk boyunca karıştırıldıktan sonra 60°C'de 25 dk karıştırılarak ısıtılmıştır. Sulu faz organik faza eklenerek önce Ultrasonikprob (20 kHz; output 200 W; Bandelin, Sonopuls HD 4200, Germany) ile 2 dk süreyle daha sonra manyetik karıştırıcıda (400 rpm) 30 dk boyunca 60°C'de karıştırılmıştır. Elde edilen emülsiyon distile suya (100 mL) eklenerek manyetik karıştırıcıda (400 rpm, 60°C), 180 dk süreyle karıştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller 11.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek toplanmış ve distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, sonraki analizler için +4°C'de saklanmıştır.

o **Yöntem 3**

Bu yöntemde %1 Span 80 içeren diklorometan organik faz olarak kullanılmıştır. Sulu fazı hazırlamak için 0,2M NaOH (5 mL) içerisinde HPMC (%1) çözündürülmüş ve elde edilen çözeltiliye 2HP- β -CD (0,2 g) eklenmiştir. Elde edilen sulu çözeltiliye EGDE (2 mL) eklendikten sonra önce manyetik karıştırıcıda (400 rpm) 5 dk süreyle karıştırılmış, daha sonra 60°C'de 25 dk boyunca karıştırılarak ısıtılmıştır. Sulu faz organik faza eklendikten sonra ultrasonik prob ile (20 kHz; output 200 W) 60°C'de 30 dk süreyle karıştırılmıştır. Elde edilen emülsiyon distile suya (100 mL) eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda (400 rpm) 60°C'de 180 dk süreyle karıştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller 11.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek toplanmış ve distile su ile 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, sonraki analizler için +4°C'de saklanmıştır.

o **Yöntem 4**

Bu yöntemde %1 Span 80 içeren diklorometan organik faz olarak kullanılmıştır. Sulu fazı hazırlamak için gama siklodekstrin (γ CD; 0,2 g) NaOH (0,2M; 5 mL) içerisinde çözülmüştür. Elde edilen bu çözeltiliye çapraz bağlayıcı olarak EGDE (2 mL) eklendikten sonra önce 5 dakika süreyle 900 rpm'de karıştırılmış daha sonra 60°C'de 25 dk süreyle karıştırılarak ısıtılmıştır. Sulu faz organik faza eklendikten sonra ultrasonikprob (20 kHz; output 200 W) ile 30 dk süreyle 400 rpm, 60°C'de karıştırılmıştır. Elde edilen emülsiyon 100 mL distile suya eklendikten sonra 180 dk süreyle 60°C'de karıştırılmıştır. Nanopartiküller 11.000 rpm'de 30 dk santrifüj edilerek toplanmıştır ve 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, sonraki analizler için +4°C'de saklanmıştır.

• **ACZ yüklü Siklodekstrin Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Etkin madde içermeyen siklodekstrin nanopartikülleri partikül büyüklüğü, yüzey yükü, etkin madde yükleme verimi açısından değerlendirilmiş, elde edilen

bulgular doğrultusunda ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküllerinin hazırlanmasında Yöntem 1'in kullanılmasına karar verilmiştir.

ACZ yüklü CD (ACZ-CD) nanopartiküllerin hazırlanması için ilk olarak 2HP- β -CD/ACZ inklüzyon kompleksi (1:1) hazırlanmıştır. Bu amaçla, 400 mg ACZ 10 mL 0,1M amonyum hidroksit (NH₄OH) içerisinde çözündürülmüştür. 400 mg 2HP- β -CD, ACZ çözeltisine 1:1 oranında eklenerek 5 gün süreyle 600 rpm'de manyetik karıştırıcı vasıtasıyla karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen çözelti santrifüjlenmiş ve çözünmeyen yapılar uzaklaştırılarak elde edilen çözelti liyofilize (-80°C; 0,05 mBar Basınç) edilmiştir. Yöntem 1'e göre ACZ nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında tek fark sulu faza CD/ACZ inklüzyon kompleksi eklenmesi olup diğer yöntem basamakları aynen uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri.

Nanopartikül	Yöntem	Polimer	Etkin Madde	Çapraz bağlayıcı	Organik Faz	Sulu faz
PHBV nanopartikülleri	Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma	PHBV	ACZ	-	Diklorometan	PVA
Siklodekstrin nanopartikülleri	Yöntem 1	2HP- β -CD	-	-	İzoforon diizosiyanat/Toluen	Tween 20
	Yöntem 2	2HP- β -CD	-	EGDE	%1 Span-80 /diklorometan	NaOH
	Yöntem 3	2HP- β -CD	-	EGDE	%1 Span-80 /diklorometan	HPMC/NaOH
	Yöntem 4	γ CD	-	EGDE	%1 Span-80 /diklorometan	NaOH
	Yöntem 1*	2HP- β -CD	ACZ	-	İzoforon diizosiyanat/Toluen	Tween 20

*ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan optimum yöntem; PHBV: Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat; ACZ:asetazolamid; 2HP- β -CD:hidroksipropil- β -siklodekstrin; γ CD: Gama siklodekstrin HPMC: Hidroksi propil metilselüloz; PVA: Polivinil alkol; EGDE:Etilen glikol diglisidil eter

3.5.2. ACZ Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan tüm nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile fiziksel özellikleri, zayıflatılmış toplam yansıma fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi analizi (ATR-FTIR, Nicolet TM ISTM 50 spektrometresi, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile kimyasal yapısı, ve ZetaSizer cihazı (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile

partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve yüzey yükü analizleri gerçekleştirilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Partikül boyutu ve etkin madde hapsedme verimi açısından nanopartiküllerin hazırlanması için Yöntem 1 seçilmiştir.

- **Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizleri**

Hazırlanan nanopartiküllerin SEM analizi, 10 keV'lik bir elektron ışını enerjisi ile çalıştırılan EVO 50 EP mikroskopu (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Silikon levhalar üzerine 5 µL nanopartikül süspansiyonu damlatıldıktan sonra azot gazı ile kurutulmuş, Hassas Yüzey Aşındırma ve Kaplama Sistemi (PECS, Model 682, Gatan Inc., Pleasanton, ABD) kullanılarak 5 nm kalınlığında altınla kaplanarak analiz için hazırlanmıştır. Alınan SEM görüntüsü (20.000X) ile nanopartiküller morfolojik özellikleri ve partikül büyüklüğü açısından değerlendirilmiştir.

- **Zayıflatılmış Toplam Yansıma Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri**

Hazırlanan CD ve ACZ-CD nanopartiküllerin kimyasal özellikleri zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller liyofilizatörde (-80°C; 0,05 mBar Basınç) kurutulduktan sonra, 2 mg örnek ATR-FTIR ölçüm haznesine yerleştirilmiş ve FTIR spektrumları belirlenmiştir. Spektrumlar, 4000 cm⁻¹ ila 600 cm⁻¹'den 16'lık bir çözünürlükle kaydedilmiştir.

- **Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizleri**

Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi analizleri dinamik ışık saçılımı yöntemiyle ZetaSizer cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Analiz, ultrasaf suya (viskozite: 0,8872 cP, refraktif indeks (RI): 1,33; dielektrik sabiti: 78,5) karşı 25°C'de ve 173° geri saçılma açısıyla gerçekleştirilmiştir. 1mg/mL konsantrasyondaki nanopartikül süspansiyonunun elektroforetik mobilitesi ölçülerek, bu değer Helmholtz-Smoluchowski eşitliğiyle

Çpotansiyel ve boyut değerlerine dönüşümü cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.

Nanopartiküllerin yüzey yükleri (Zeta potansiyel) Lazer Doppler Micro elektroforez metodu ile ölçülmüştür. Hazırlanan nanopartiküller deionize su ile süspand edilmiş (1 mg/mL), ve yaklaşık 1mL örnek yük ölçüm kuvetine konularak, süspansiyon içerisinde elektrik akımının geçirilmesi ile partikül yükü belirlenmiştir. Doppler prensibi kullanılarak elektrik alanı uygulanan partiküllerin hızının ölçümü ile yüzey yükleri ölçülmüştür.

3.5.3. Nanopartiküllerin Degradasyon Süresinin Belirlenmesi

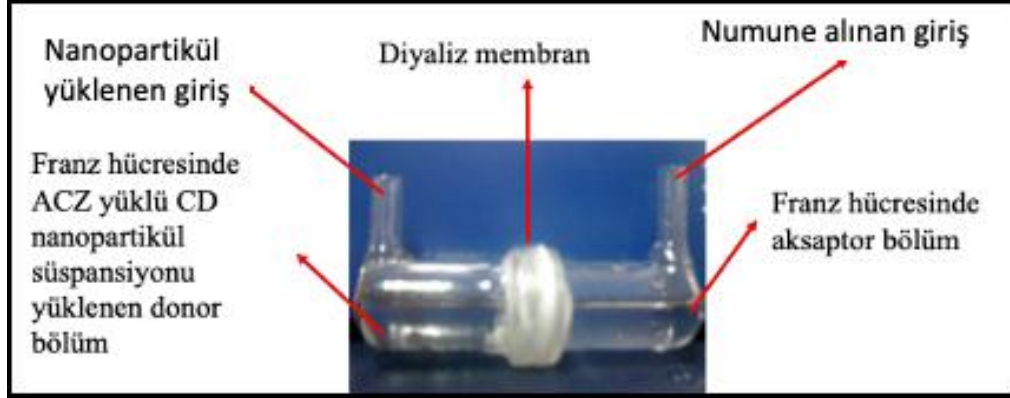
ACZ-CD ve CD nanopartiküllerinin degradasyon özellikleri türbidimetre cihazı (Lovibond, TB 300, IR, ABD) ile ölçülmüştür. CD ve ACZ-CD nanopartikülleri (n=3), fosfat tamponlu salin (*phosphate buffered saline*, PBS) içerisinde süspand edildikten sonra 20 hafta süreyle farklı sıcaklıklarda (4°C ve 37°C) inkübe edilmiştir. Örneklerin türbidimetrik absorbansları haftalık olarak kaydedilmiştir. Nanopartikül süspansiyonunun başlangıç absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiş ve bundan sonraki ölçümler buna oranlanarak belirlenmiştir.

3.5.4. ACZ Yükleme Oranının ve Salım Profillerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllere etkin madde yükleme oranının belirlenmesi için doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Doğrudan yöntemde nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı belirlenirken; dolaylı yöntemde hem süpernatant'da hem de nanopartiküllerin yıkanmaları esnasında sulu ortamda kalan ACZ miktarı belirlenmektedir. Tez çalışması kapsamında, ACZ yükleme oranı (YV%) dolaylı yöntem ile belirlenmiştir. Bunun için, nanopartiküllerin hazırlanmasından sonra dış fazda (süpernatant) kalan yüklenmemiş ve yıkama sularındaki ACZ'nin (3 kez 10 mL distile su ile yıkanmıştır); ilk eklenen ACZ miktarından çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Yükleme verimi (YV%) Eşitlik 4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$YV\% = \frac{\text{Başlangıçtaki eklenen ACZ} - \text{yüklenmemiş ACZ}}{\text{Başlangıçtaki eklenen ACZ}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Nanopartiküllerden ACZ salımı Franz difüzyon hücresi kullanılarak tayin edilmiştir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. ACZ salım çalışmalarında kullanılan Franz difüzyon hücresi.

Salım çalışmaları yarı geçirgen diyaliz membranı (Molecular weight cut-off 14-12 kDa; Sigma) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diyaliz membranı bir gece önceden difüzyon ortamı (PBS; pH 7,4) ile ıslatılmıştır. Franz difüzyon hücresinin iki bölmesi arasında diyaliz membranı yerleştirildikten sonra ACZ-CD nanopartikülleri (10mg NP) lizozim (10mg/mL) içeren PBS tamponunda (5 mL) süspande edilerek donör bölümüne eklenmiş; alıcı (receiver) bölümüne ise sadece 5 mL lizozim içeren fosfat tamponu eklenmiştir (Şekil 3.1.). Salım deneyleri $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 100 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360 dakika, 20, 24, 26, 28, 36 saat) alıcı bölmeden 500 μL örnek alınarak yerine taze tampon eklenmiştir. Alınan numunelere (500 μL) 0,1M NH_4OH çözeltisi (50 μL) eklendikten sonra absorbans değeri 294 nm'de nanodrop kullanılarak tayin edilmiştir. Salım çalışmaları üç tekrarlı çalışılmıştır.

3.6. ACZ Yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin *in vitro* Sitotoksitesinin ve Etkinliğinin İncelenmesi

Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksik etkisinin ve etkinliğinin incelenmesi amacıyla İnsan Retina Mikrovasküler Endotelial Hücre (HRMEC) hattı kullanılmıştır. Tez çalışmaları kapsamında DRP hücre kültür modellemesi ile hazırlanan nanopartiküler sistemin *in vitro* KRB etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda TEER ve geçirgenlik testlerinin yapılması planlanmıştır.

3.6.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Geliştirilen ACZ-CD nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksosite ve geçirgenlik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan hücre kültürü çalışmalarında HRMEC hattı (pasaj sayısı: 4-5) kullanılmıştır.

HRMEC, endotel hücreleri için spesifik Cell Systems besiyer ile kültüre edilmiştir. Hücreler için tam kültür ortamı, 500 mL besiyeri (complete medium), 5 mL büyüme faktörleri içeren serum (CultureBoost™) ve Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalar için etkili antibiyotik (Bac-Off®) içermektedir. Hücrelerin hücre kültür plakaları ve insertlerin yüzeyine tutunması için hücre dışı matris reaktifi içeren Attachment Factor™ ile kaplanmıştır.

Azot tankında -196 °C’de kryo tüplerde muhafaza edilen HRMEC hücreleri (pasaj sayısı: 4-5) 37°C’lik su banyosunda çözündürülerek 4000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş, dibe çöken hücreler taze olarak hazırlanan kültür ortamında süspande edildikten sonra 25 cm²’lik T-Flask’lara aktarılmıştır. Flasklar 37°C, %5 CO₂ ve %95 bağıl nem ortamında inkübe edilerek pasajlama aşamasına kadar her iki günde bir kültür ortamı yenilenmiştir. Hücreler yoğunlukları %80-90 oranına ulaştığında pasajlanmıştır. Hücrelerin pasajlanmasında PRG-1™ (EDTA-dPBS), PRG-2™ (Trypsin/EDTA-dPBS) ve PRG-3™ (Trypsin Inhibitor-dPBS) çözeltileri kullanılmıştır. Öncelikle flask içindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve 5 mL PRG-1™ ile yıkanmıştır. Flask yüzeyine tutunan hücreleri kaldırmak için 5 mL PRG-2™ (Trypsin/EDTA-dPBS) çözeltisi eklenmiş ve 37°C’lik inkübatörde 3 dk tutulmuştur. PRG-2™ çözeltisini inhibe etmek için, hücre süspansiyonuna 5 mL PRG-3™ (Trypsin Inhibitor-dPBS) eklendikten sonra santrifüj tüpüne aktarılarak 4000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra dibe çöken hücreler taze kültür ortamı ile süspanse edilmiştir. Flasklara 5 mL Attachment Factor™ eklenmiş ve 1 dk bekletildikten sonra fazlası alınarak flask yüzeyinin kaplanması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu 1:2 pasajlanarak yeni flasklara aktarılmış ve çoğaltılmıştır.

On iki kuyucuklu plakaya insertler (0,4 µm, polikarbonat) yerleştirilmiş ve insert yüzeyleri Attachment Factor™ ile kaplanmıştır. Tripan mavisi ile HRMEC

hücrelerinin canlı hücre sayısı belirlendikten sonra bir kuyucuğun apikaline (üst bölme) kültür ortamındaki hücre süspansiyonu (100.000 hücre/500µL) bazolateral tarafına ise 1,5 mL kültür ortamı eklenmiştir. Hücreler 37°C, %5 CO₂ ve %95 bağıl nem ortamında inkübe edilmiş ve her iki günde bir kültür ortamı yenilenmiştir. HRMEC hücrelerinin TEER değeri Epitel Volt/Ohm Metre (EVOM2) ile ölçülmüştür ve eşitlik 5 kullanılarak TEER değerleri belirlenmiştir. TEER değerleri 20-40ohm.cm² üzerinde olan hücreler geçirgenlik deneylerinde kullanılmıştır (48).

$$\text{TEER (Ohm.cm}^2\text{)}=(A_{\text{Örnek}}-A_{\text{Kontrol}})\times B \quad (\text{Eşitlik 5})$$

A: Kuyucuktan ölçülen voltmetre değeri

B: İnsertlerin yüzey alanı (cell monolayer) (1,13 cm²)

3.6.2. Geliştirilen Siklodekstrin Nanopartiküllerin HRMEC Hücre Hattında Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda serbest ACZ, etkin madde yüklenmemiş boş CD, ACZ-CD nanopartiküllerin HRMEC hücrelerine sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda doksan altı kuyucuklu plakada herbir kuyucuk Attachment Factor™ ile kaplandıktan sonra, tripan mavisi ile boyama sonrası thoma lamı kullanılarak canlı hücre sayısı belirlenen HRMEC hücreleri 5000 hücre/kuyucuk konsantrasyonda eklenmiş ve plakalar 37°C'de (%5 CO₂ve %95 bağıl nem) inkübe edilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunması ışık mikroskobu ile kontrol edilmiştir. Hücreler kuyucuk yüzeyinin %90'nını kapladıktan sonra MTT deneylerinde kullanılmıştır.

Nanopartiküller 0,45µm çapındaki enjektör filtreleri ile filtre edildikten sonra tüplere alınarak 30 dk. UV ışık altında sterilize edilmiştir. Nanopartiküller hücre kültür ortamı ile seyreltildikten sonra 96 kuyucuklu plaklara farklı konsantrasyonlarda (1, 50, 100, 250 ve 500µg/mL) nanopartikül ve serbest ACZ içerecek şekilde 200 µL eklenmiştir. Plakalar 24 saat inkübe edildikten sonra besiyeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 200 µL MTT reaktifi (0,5mg/mL, hücre kültür ortamında) eklenmiştir. 4

saat inkübasyonun ardından kuyucuklara 200 μ L 0,04 M HCl içeren saf izopropanol ilave edilmiş ve 30 dk bekletildikten sonra plak 570 nm'de mikropalak okuyucuda okutulmuştur.

MTT testleri altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol kuyucuklarının (sadece HRMEC hücrelerinin bulunduğu) absorbands değerlerinin ortalaması %100 kabul edilerek test kuyucuklarının absorbandsları ile mukayese edilmiş ve sitotoksik etki yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

3.6.3. HRMEC Hücre Kültüründe Diyabetik Retinopati Modelinin Geliştirilmesi

HRMEC hücre hattında diyabetik retinopati modelinin (DRP) oluşturulması amacıyla literatürde de yaygın olarak kullanılan VEGF kullanılmıştır (268,269). Tez çalışmaları kapsamında 150 ng/mL konsantrasyonda VEGF içeren besiyeri kullanılmıştır. HRMEC hücreleri Bölüm 3.4.1.'de belirtildiği gibi kültüre edilmiştir. TEER ölçüm sonuçlarına göre hücre bütünlüğü belirlendikten sonra (ortalama 40 ohm.cm²), bir insert kontrol grubu olarak (sadece HRMEC), bir insert de DRP hastalık modeli grubu (HRMEC+VEGF) belirlenmiştir. HRMEC grubunun sadece besiyeri değiştirilirken, HRMEC+VEGF grubunun besiyeri 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri ile değiştirilmiştir (0. saat). HRMEC hücrelerinde DRP modelinin gelişmesine bağlı olarak transepitelyal elektriksel direnç (TEER) değerlerinde bir azalma beklenmektedir. Bu nedenle HRMEC hücre hattında DRP modelinin oluşmasının değerlendirilmesinde, TEER ölçümleri esas alınmıştır. Besiyeri değişiminden sonra 24 saat boyunca, belirli aralıklarla (4, 12, 24 ve 36 saat) TEER değerleri ölçülmüştür. Literatürde 12 kuyucuklu inserte ekilen HRMEC hücreleri için TEER değerinin 20-40 ohm.cm² olduğu belirtilmiştir (287).

TEER çalışmaları kapsamında literatürde açıklandığı gibi öncelikle sadece besiyeri içeren bir grup alınarak bu gruba TEER testi yapılmış ve elde edilen değer, çalışmadaki diğer grupların test sonuçlarının hesaplanmasında kullanılmıştır (Kontrol). Çalışma gruplarına ait TEER değerleri hesaplanırken, her bir çalışma grubu için elde edilen TEER değeri ölçülerek sadece besiyeri içeren (Kontrol) grubun TEER

değerine olan farkı alınmıştır. Örneğin kontrol grubunun TEER değeri 220 ohm.cm², HRMEC grubunun TEER değeri 260 ohm.cm² olarak ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre düzeltme yapıldıktan sonra HRMEC grubu için için TEER değeri 45,2 ohm.cm²olarak belirlenmiştir.

3.6.4. Diyabetik Retinopati Geliştirilmiş Hücre Kültürü Modelinde ACZ Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin TEER Testleri ile Değerlendirilmesi

Geliştirilen ACZ yüklü siklodekstrinlerin *in vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla DRP geliştirilmiş hücre hatlarında TEER değerleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. TEER çalışmaları kapsamında beş grup belirlenmiştir.

Grup 1 (HRMEC), sadece sağlıklı HRMEC hücre hattı ve besiyeri içeren sağlıklı kontrol grubu olup sağlıklı normal KRB'nin var olduğu durumu temsil etmektedir. Bu grubun TEER testleri sonuçları, diğer gruplardan elde edilen sonuçların tedavi edici etkisinin olup olmadığını yorumlanması aşamasında kullanılmıştır.

Grup 2 (HRMEC+VEGF), DRP hastalık modelini temsil etmektedir

Grup 3 (HRMEC+VEGF+CD NP), DRP hastalık modelinde, etkin madde içermeyen boş CD-NP uygulamasını temsil etmektedir

Grup 4 (HRMEC+VEGF+ACZ), DRP hastalık modelinde, serbest ACZ uygulamasını temsil etmektedir

Grup 5 (HRMEC+VEGF+ACZ-CD-NP), DRP hastalık modelinde, ACZ yüklü CD-NP uygulamasını temsil etmektedir.

TEER çalışmaları kapsamında incelenen gruplar ve çalışma planı Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. TEER çalışmaları kapsamında, incelenen gruplar ve çalışma planı.

Grup ismi ve kodu	0.Saatte hücrelerin muamele edildiği ortam	İlk 24 saat boyunca, ortama eklenen besiyerinin içeriği	24-36. saatler arasında ortama eklenen besiyerinin içeriği	36 saat sonunda hücrelerin muamele edildiği ortam
Grup 1 (HRMEC)	besiyeri	besiyeri	besiyeri	besiyeri
Grup 2 (HRMEC+VEGF)	besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri
Grup 3 (HRMEC+VEGF+CD NP)	besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + boş CD NP içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + boş CD NP içeren besiyeri
Grup 4 (HRMEC+VEGF+ACZ)	besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + serbest ACZ içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + serbest ACZ içeren besiyeri
Grup 5 (HRMEC+VEGF+ACZ-CD-NP)	besiyeri	150 ng/ml VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + ACZ-CD NP içeren besiyeri	HRMEC ve 150 ng/ml VEGF + ACZ-CD NP içeren besiyeri

HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; KRB: Kan Retina Bariyeri; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; DRP: Diyabetik Retinopati; CD: Siklodektrin; ACZ: Asetazolamid; ACZ – CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodektrin nanopartikül

Bölüm 3.4.1.'de belirtildiği gibi hazırlanan İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı (HRMEC) yüzeyi hücre bağlanma faktörü ile kaplanmış 0,4 µm por çapına sahip polikarbonat membran insertlere ekilerek beş gruba ayrılmış (Tablo 3.2), ve 37°C, %5 CO₂ ve %95 bağıl nemde inkübe edilmiştir. TEER ölçüm sonuçlarına göre hücrelerin tüm yüzeyi kapladığı belirlendikten sonra (0.saat), ilk 24 saat boyunca, Grup 1 sadece besiyeri ile, Grup 2, 3, 4 ve 5 (DRP grupları) ise 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilmiştir. DRP gruplarında (Grup 2-5) 24 saatlik süre boyunca uygun aralıklarla (4., 12. ve 24. saat) TEER ölçümleri yapılarak DRP hastalık modelinin gelişimi teyit edilmiştir. 24. saatin sonunda Grup 1, sağlıklı kontrol grubu olarak, Grup 2-5 ise DRP hastalık modeli olarak belirlenmiştir. 24. saatin sonunda Grup 2, DRP hastalık modeli olarak belirlenerek sadece 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri ile muamele edilmeye devam edilmiştir. Grup 3: 150 ng/mL VEGF ve boş CD NP içeren besiyeri ile, Grup 4: 150 ng/ml VEGF ve serbest ACZ içeren besiyeri ile, Grup 5: 150 ng/mL VEGF ve ACZ-CD-NP içeren besiyeri ile 12 saat süreyle (24-36. saatler arası) muamele edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda (36. saat sonunda) her bir grubun TEER değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma Anova/Tukey testi ile yapılmıştır.

3.6.5. Diyabetik Retinopati Geliştirilmiş Hücre Kültürü Modelinde ACZ Yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin Geçirgenlik Testleri ile Değerlendirilmesi

Diyabetik retinapatinin patogeneğinde KRB harabiyeti ve damar geçirgenliğinin artışı rol oynadığı için (141). DRP'nin *in vitro* değerlendirilmesinde hücre geçirgenlik testleri kullanılmaktadır.

Geliştirilen ACZ yüklü siklodekstrinlerin *in vitro* etkinliğini geçirgenlik testleriyle belirlemek amacıyla DRP geliştirilmiş hücre hatlarında 70 kDa FITC ile konjuge edilmiş dekstran (500 µg/mL; Fluoresein izotiyosiyanat-dekstran) kullanılmıştır. Geçirgenlik çalışmaları kapsamında beş grup belirlenmiştir.

Grup1 (HRMEC), sadece sağlıklı HRMEC hücre hattı ve besiyeri içeren sağlıklı kontrol grubu olup sağlıklı normal KRB'nin var olduğu durumu temsil etmektedir. Bu grubun geçirgenlik testleri sonuçları, diğer gruplardan elde edilen sonuçların tedavi edici etkisinin olup olmadığının yorumlanması aşamasında kullanılmıştır.

Grup 2 (HRMEC+VEGF), DRP hastalık modelini temsil etmektedir

Grup 3 (HRMEC+VEGF+CD NP), DRP hastalık modelinde, etkin madde içermeyen boş CD-NP uygulamasını temsil etmektedir

Grup 4 (HRMEC+VEGF+ACZ), DRP hastalık modelinde, serbest ACZ uygulamasını temsil etmektedir

Grup 5 (HRMEC+VEGF+ACZ-CD-NP), DRP hastalık modelinde, ACZ yüklü CD-NP uygulamasını temsil etmektedir.

Geçirgenlik çalışmaları kapsamında, incelenen gruplar ve çalışma planı Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Geçirgenlik çalışmaları kapsamında, incelenen gruplar ve çalışma planı.

Grup ismi	0.Satte grupta yer alan maddeler	İlk 48 saat boyunca, ortama eklenen besiyerinin içeriği	48-96. saatler arasında ortama eklenen besiyerinin içeriği	96. saat sonunda hücrelerin muamele edildiği ortam
Grup 1	HRMEC ve besiyeri	Sadece besiyeri	Sadece besiyeri	HRMEC ve besiyeri
Grup 2	HRMEC ve besiyeri	150 ng/mL VEGF içeren besiyeri	150 ng/mL VEGF içeren besiyeri	HRMEC ve 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri
Grup 3	HRMEC ve besiyeri	150 ng/mL VEGF içeren besiyeri	150 ng/mL VEGF + etkin madde içermeyen boş CD NP içeren besiyeri	HRMEC ve 150 ng/mL VEGF + etkin madde içermeyen boş CD NP içeren besiyeri
Grup 4	HRMEC ve besiyeri	150 ng/mL VEGF içeren besiyeri	150 ng/ml VEGF + serbest ACZ içeren besiyeri	HRMEC ve 150 ng/ml VEGF + serbest ACZ içeren besiyeri
Grup 5	HRMEC ve besiyeri	150 ng/mL VEGF içeren besiyeri	150 ng/mL VEGF + ACZ-CD NP içeren besiyeri	HRMEC ve 150 ng/mL VEGF + ACZ-CD NP içeren besiyeri

HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; KRB: Kan Retina Bariyeri; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; DRP: Diyabetik Retinopati; CD: Siklodektrin; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodektrin nanopartikül

Bölüm 3.4.1.'de belirtildiği gibi hazırlanan insan retina mikrovasküler endotel hücre hattı (HRMEC) insertlere ekilerek beş gruba ayrılmıştır (Tablo 3.3.). TEER ölçüm sonuçlarına göre hücrelerin tüm yüzeyi kapladığı belirlendikten sonra (0. saat), ilk 48 saat boyunca, Grup 1 sadece besiyeri ile, Grup 2, 3, 4 ve 5 ise 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilmiştir. 48 saat boyunca belirli aralıklarla TEER değerleri ölçülerek DRP hastalık modeli gelişimi teyit edilmiştir. 48 saatin sonunda Grup 1, Sağlıklı Kontrol grubu olarak, Grup 2-5 ise DRP hastalık modeli olarak belirlenmiştir. 48. saatin sonunda, Grup 2 sadece 150 ng/mL VEGF içeren besiyeri ile muamele edilmeye devam edilmiştir. Grup 3: 150 ng/mL VEGF ve boş CD-NP içeren besiyeri ile, Grup 4: 150 ng/mL VEGF ve serbest ACZ içeren besiyeri ile, Grup 5: 150 ng/mL VEGF ve ACZ-CD-NP içeren besiyeri ile 48 saat daha muamele edilmiştir. (48-96. saatler arası) (Tablo 3.3.). İnkübasyon süresinin sonunda (96. saatin sonunda) gruplara geçirgenlik testi yapılmıştır.

• Geçirgenlik Testleri

Geçirgenlik testleri için iki kompartmanlı bir sistem kullanılmıştır. Bunun için 12 kuyucuklu plaka içine 0,4 µm por çapına sahip polikarbonat membrandan oluşan bir insert yerleştirilmiştir. İnsertlerin yüzeyi bağlanma (attachment) faktörü ile

kaplandıktan sonra HRMEC hücreleri insertlere ekilmiştir. Hücreler eklendikten 24 saat sonra TEER değerleri ölçülmüş ve hücrelerin insert yüzeyini kaplayıp kaplamadıkları elde edilen TEER değerleri ile belirlenmiştir (40 ohm.cm²). Üst kompartmanda bulunan besi yeri (0,5 mL), aynı hacimde 70 kDa FITC ile konjuge edilmiş dekstran (500 µg/mL; Fluoresein izotiyosiyanat-dekstran) takip ajanını içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. 2 saat inkübasyonun ardından alt bölmede bulunan besiyeri (1,5 mL) alınmış ve takipçi ajanın konsantrasyonları 528 nm emisyon/485 nm eksitasyon dalga boyunda floresan okuyucu kullanılarak belirlenmiştir.

Geçirgenlik çalışmaları kapsamında literatürde açıklandığı gibi öncelikle sadece besiyeri içeren bir grup alınarak bu gruba geçirgenlik testi yapılmıştır. Çalışma sırasında, test sonuçlarında alt kompartmana geçen madde konsantrasyonu o çalışma için standart kabul edilmiştir. Çalışma kapsamında bu grubun geçirgenlik testi sonunda alt kompartmanda tayin edilen 70 kDa konjuge Fluoresein izotiyosiyanat-dekstran konsantrasyonu 55,96 µg/mL'dir. Çalışma gruplarında yapılan geçirgenlik analizlerinde, geçirgenlik değeri olarak, her bir grupta alt kompartmandan tayin edilen referans madde konsantrasyonunun 55,96 µg/mL değerine oranı alınmıştır.

3.7. Geliştirilen ACZ yüklü Siklodekstrin Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin *in vivo* Toksisitesinin ve Etkinliğinin İncelenmesi

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinlik ve güvenilirliğinin incelenmesi amacıyla *in vivo* çalışmaların yapılması planlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda tavşan gözlerinde DRP modeli oluşturulmuş ve geliştirilen ACZ-CD nanopartiküller intravitreal olarak uygulanmıştır. İntravitreal uygulama sonrası planlanan zaman aralıklarında oftalmolojik muayene ve tetkikler yapılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. *In vivo* etkinliğin değerlendirilmesinde, fundus muayenesi ve renkli fundus fotoğrafı (RFF), optik koherens tomografi (OKT), fundus fluoresein anjiyografi (FFA) ve fundus fluorofotometri (FFFM) tetkiklerinin sonuçları incelenmiş, toksisitesinin değerlendirilmesinde de göz içi basıncı ölçümü ve ön segment muayenesinin sonuçları değerlendirilmiştir. *In vivo* çalışmalar için Ankara Hastanesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Etik Kurulu'ndan 26.5.2017 tarih ve 39 sayılı etik

kurulu onayı alınmıştır. *In vivo* çalışmalar Ankara Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilmiş etik ilkelere ve esaslara göre yürütülmüştür.

Göz hastalıklarında ilaç etkinliğinin incelenmesi amacıyla yapılacak çalışmalarda farklı deney hayvanları kullanılmakla birlikte insan gözüne benzerliği sebebiyle, sıklıkla önerilen ve literatürde de yaygın olarak kullanılan deney hayvanı tavşandır (290, 291). Bu nedenle *in vivo* çalışmalarda deney hayvanı olarak tavşan seçilmiştir.

3.7.1. Deney Hayvanı ve Anestezi

• Deney Hayvanı

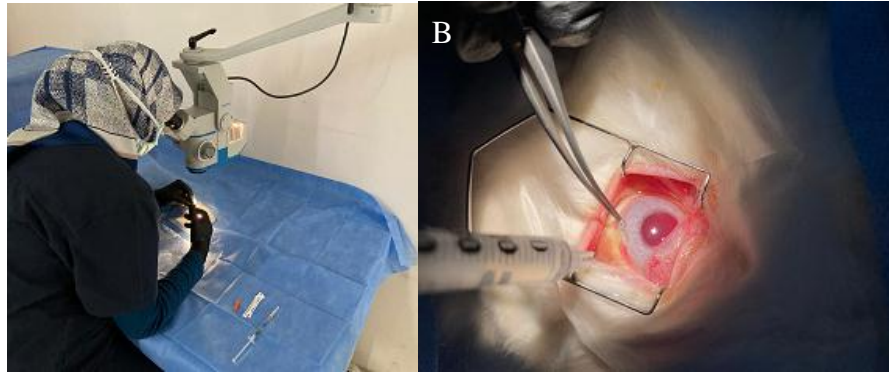
Tez kapsamında yapılan *in vivo* çalışmalarda 2-3 kg ağırlığında, dişi beyaz Yeni Zelanda (Charles River, Calco, Lecco, Italy) tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Tavşanlar, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, $\%55\pm 5$ bağıl nem bulunan havalandırma sistemine sahip bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde tutulmuştur. Deney hayvanları, standart laboratuvar diyeti ile beslenmiş ve uygulamadan önce en az 2 hafta süre ile standart şartlara adapte edilmiştir. Tavşanlara yapılan tüm işlemler anestezi altında gerçekleştirilmiş ve planlanan zaman aralıklarında tüm tavşanlar yüksek doz anestezi ile feda edilmiştir.

• Anestezi

Tez çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen deneylerde tavşanlara uygulanacak anestezik madde veteriner hekim gözetiminde uygulanmıştır. Tavşanlara anestezik ajan olarak Xylazine (5 mg/kg) + ketamin (35 mg/kg) kombinasyonu intramusküler yolla uygulanmıştır. Her tavşan, enjeksiyondan önce tartılarak verilecek doz hesaplanmıştır. Enjeksiyondan sonra her tavşan az ışık gören ve sessiz ortamda 10 dk bekletilmiştir.

• İntravitreal Enjeksiyon

İntravitreal enjeksiyon, uygun cerrahi hazırlığı takiben tavşanların sağ gözlerine üst temporalden, limbustan 2,5 mm uzaklıktan yapılmıştır. Enjeksiyondan sonra göze subkonjoktival antibiyotik uygulanmıştır (Şekil 3.2.). Enjeksiyon sonrası skleral giriş yerine 1dk boyunca pamuk uçlu aplikatör ile baskı yapılmıştır. Enjeksiyon sonrası tavşanlara 5 gün boyunca topikal antibiotik uygulanmıştır.



Şekil 3.2. İntravitreal enjeksiyon uygulaması (A) İntravitreal enjeksiyon tekniği (B).

3.7.2. Tavşanlarda DRP Modelinin Oluşturulması

Tavşanlarda DRP hastalık modeli geliştirmek için literatürde en sık tercih edilen yöntem intravitreal VEGF uygulamalarıdır (289-290). Tez kapsamında da DRP modeli oluşturmak için, intravitreal VEGF enjeksiyonu tercih edilmiştir. Literatürde DRP oluşumu için, 500 ng, 1µg, 2.5 µg veya 10 µg gibi farklı dozlarda intravitreal VEGF uygulamaları mevcuttur (290-293). Tez çalışması kapsamında literatürde sıklıkla kullanılan üç farklı konsantrasyon seçilmiş ve DRP grubundan 3 tavşana (6,7,8 no'lu tavşanlar) bu üç farklı konsantrasyon uygulanmıştır. Bu kapsamda öncelikle tavşanların sağ gözlerine intravitreal olarak 1µg VEGF (6 no'lu tavşan), 10 µg (7 no'lu tavşan) ve 2.5 µg (8 no'lu tavşan) VEGF enjekte edilmesi planlanmıştır (270-273). Uygulamadan 72 saat sonra yapılan muayenelerde, tavşan gözlerinde DRP bulgularının gelişip gelişmediği değerlendirilmiştir. DRP gelişimi için, DRP derecesinin 3 olması şartı kabul edilmiştir. Hastalık modeli gelişimi sürecinde elde edilen sonuçların detaylı takip ve değerlendirilmesini sağlamak için 3 tavşana yapılan uygulamalar aynı zamanda değil, ardışık olarak yapılmıştır. Bu amaçla önce 6

numaralı tavşana uygulama yapılarak takip edilmiş sonra 7 numaralı ve en son da 8 numaralı tavşan da uygulama yapılmıştır. Üç tavşanda yapılan hastalık modeli geliştirme çalışmasının sonucunda 72. saatte tavşan gözünde DRP derecesi 3 düzeyinde hastalık modeli geliştiren yöntem seçilerek çalışmada kullanılmıştır. Çalışma boyunca, tercih edilen yöntemle DRP hastalık modeli geliştirilen tüm tavşanlarda, 72. saatte yapılan muayene ve tetkiklerle DRP hastalık modelinin gelişmesi teyit edilmiştir. 72. saatte yapılan ölçümlerde, diyabetik retinopati hastalık modeli gelişmediği izlenen tavşanlar çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışma sürecinde intravitreal VEGF düzeyini korumak için DRP oluşturulmuş tüm tavşanlara ilk VEGF enjeksiyonundan itibaren 7., 14., 21. ve 28., günlerde iv olarak 2.5µg VEGF enjeksiyonu tekrarlanmıştır.

3.7.3. *In vivo* Çalışma Planı ve Çalışma Grupları

İnvivo çalışmaya toplam 30 tavşan dahil edilmiştir. Tavşanlar randomize, her biri 5 tavşandan oluşan 6 gruba ayrılmıştır.

Grup 1 Sağlıklı ve hiçbir uygulama yapılmayan tavşanlar sağlıklı göz bulgularını göstermek amacıyla kullanılmıştır

Grup 2 DRP oluşturulmuş ve hiçbir tedavi uygulanmadan takip edilmiş olan tavşanlar hastalığın tedavisiz doğal seyrini göstermek amacıyla negatif kontrol grubu olarak alınmıştır

Grup 3 DRP oluşturulmuş ve herhangi bir tedavi edici etkinliği olmayan PBS (100µL) intravitreal uygulanmasıyla intravitreal enjeksiyonun mekanik etkilerini irdelemek amacıyla kullanılmıştır. Burada hedef uygulama yoluna bağlı değişikliklerin irdelenmesidir

Grup 4 DRP hastalık modeli oluşturulduktan sonra intravitreal serbest ACZ (0,5mg/100µL) uygulanan tavşanlar etkin maddenin serbest formunun uygulanması ile elde edilecek etkinin irdelenmesi amacıyla kullanılmıştır

Grup 5 DRP oluşturulmuş ve intravitreal ACZ yüklü CD nanopartikül uygulanan tavşanlar ((1mg NP/100 μ L; 1mg NP 0,5mg ACZ içermektedir). Burada amaç tez çalışmaları kapsamında geliştirilerek karakterize edilen ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküllerin tavşan gözlerindeki etkinlik ve toksisite çalışmalarının yapılmasıdır

Grup 6 DRP oluşturulmuş ve intravitreal bevasizumab (1,25 mg/100 μ L) uygulanan tavşanlar. DRP hastalık modeli oluşumundan sonra DRP tedavisinde dünyada halen en sık kullanılan tedavi seçeneğinin uygulandığı gruptur. Bu grup çalışmada pozitif kontrol grubu olarak seçilmiştir.

İstatistiksel incelemelerde, belli bir zamanda alınan mauyene bulgularının tanımlanmasında, ölçüm tanımı kullanılmıştır. Ölçüm, muayenenin yapılarak bulgunun kaydedildiği zamanı tanımlamaktadır.

1. Ölçüm: Tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesidir

2. Ölçüm: DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayenedir

3. Ölçüm: Tedavi sonrası 1. hafta muayenesidir (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'de tavşanlara bu ölçüm zamanında herhangi bir tedavi uygulanmamıştır ancak gruplararası karşılaştırmalarda ortak tanımlama kullanılması için bu isimlendirme tercih edilmiştir)

4. Ölçüm: Tedavi sonrası 1. ay muayenesidir (Grup 1, Grup 2 ve Grup 3'de tavşanlara bu ölçüm zamanında herhangi bir tedavi uygulanmamıştır ancak gruplararası karşılaştırmalarda ortak tanımlama kullanılması için bu isimlendirme tercih edilmiştir)

In vivo çalışmalar kapsamında belirlenen gruplar ve takip edilmiş iş planı Tablo 3.4.'te sunulmuştur.

Tablo 3.4. *In vivo* çalışmalar kapsamında belirlenen gruplar ve takip edilmiş iş planı.

Zaman	0. gün	3. gün	7. gün	10. gün	14. gün	21. gün	28. gün	31. gün
Çalışma grubu								
Grup 1	1. Muayene	2. Muayene		3. Muayene				4. Muayene
Grup 2	1. Muayene / VEGF enj.	2. Muayene	VEGF enj.	3. Muayene	VEGF enj.	VEGF enj.	VEGF enj.	4. Muayene
Grup 3	1. Muayene / VEGF enj.	2. Muayene / PBS enj.	VEGF enj.	3. Muayene	VEGF enj.	VEGF enj.	VEGF enj.	4. Muayene
Grup 4	1. Muayene / VEGF enj.	2. Muayene / ACZ	VEGF enj.	3. Muayene	VEGF enj.	VEGF enj.	VEGF enj.	4. Muayene
Grup 5	1. Muayene / VEGF enj.	2. Muayene / ACZ-CD NP. enj.	VEGF enj.	3. Muayene	VEGF enj.	VEGF enj.	VEGF enj.	4. Muayene
Grup 6	1. Muayene / VEGF enj.	2. Muayene / bev enj.	VEGF enj.	3. Muayene	VEGF enj.	VEGF enj.	VEGF enj.	4. Muayene

enj: intravitreal enjeksiyon; Muayene: Ön segment muayenesi, göz içi basıncı ölçümü, fundus muayenesi ve fotoğraf çekimi, optik koherens tomografi, fundus florosein anjiyografi ve fundus florofotometri ölçümleri; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; PBS: fosfat tamponlu salin; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül; bev: bevacizumab

1. muayene: Çalışmanın ilk günü yapılmıştır. Tavşan gözlerine kontrol muayenesi yapılmış sonra Grup 2, 3, 4, 5 ve 6'daki tavşanlara DRP modeli oluşturmak için 2.5 µg/100µL VEGF enjekte edilmiştir.

2. muayene: Çalışmanın 3. günü yapılmıştır. Önce muayene ile DRP modeli geliştiği teyid edilmiş daha sonra, Grup 2,3,4,5 ve 6'daki tavşanlara, planlanan intravitreal enjeksiyonlar uygulanmıştır.

3. muayene: Çalışmanın 10. günü yapılmıştır. Tedavi sonrası 1. hafta muayenesidir.

4. muayene: Çalışmanın 31. günü yapılmıştır. Tedavi sonrası 1. ay muayenesidir.

1.,2.,3. Ve 4. muayenelere ait sonuçların istatistiksel incelemelerinde, her bir muayeneye ait veriler 1. ölçüm, 2. ölçüm, 3. ölçüm ve 4. ölçüm olarak tanımlanmıştır.

3.7.4. Oftalmoskopik Muayene ve Tetkikler

Tavşan gözlerine her muayene esnasında yapılacak işlemlerin sıralaması yapılarak sürecin optimizasyonu sağlanmıştır. Her muayene seansında yapılan işlemler aşağıda belirtilen kronolojik sıraya göre gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir.

- **Ön Segment Muayenesi ve Görüntülenmesi**

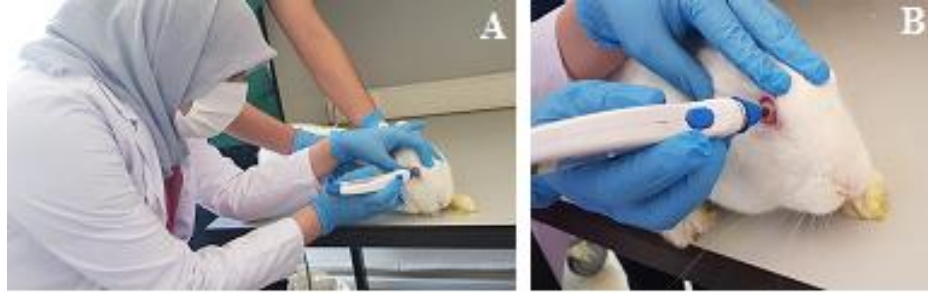
Ön segment muayeneleri işlem öncesi ve işlem sonrası planlanan zaman aralıklarında taşınabilir el biyomikroskobu (Hawk Eye, Dioptrix, Fransa) ile yapılarak ön segment yapıları değerlendirilmiş ve ön segment fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 3.3.). Ön segment muayene bulguları, enfeksiyon, inflamasyon ve kanama varlığı açısından takip edilmiştir.



Şekil 3.3. Tavşanların elde taşınabilir dijital biyomikroskobu ile ön segment muayenesi ve görüntülenmesi.

- **Göz İçi Basıncı Ölçümü**

Göz içi basınç ölçümleri taşınabilir tonometre (Tono-Pen AVIA Tonometre) cihazı ile yapılmıştır. Bu amaçla tavşanlar ölçümden önce 10 dk sakin ve sessiz bir ortamda bekletildikten sonra topikal anestezi uygulanmıştır. Göz kapaklarının nazikçe açılmasının ardından tonometre cihazı santral korneaya hafifçe temas ettirilerek ölçümler alınmıştır. Cihaz 10 ölçüm sonucunda ortalama değeri sonuç ölçümü olarak kabul ettiğinden her bir ölçümde 10 ölçüm yapılarak ölçüm sonuçları oluşturulan veri çizelgesine kaydedilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Tavşan gözüne tonometre cihazı ile göz içi basıncı ölçümleri (A ve B).

- **Gözbebeği Dilatasyonu (Midriasis)**

Arka segment muayenesi, fundus fotoğrafı çekilmesi, OKT, FFA ve FFFM tetkikleri öncesinde, tavşanların sağ gözleri dilate edilmiştir. Bu amaçla işlemden yaklaşık 15 dk önce tavşanın göz bebeğine fenilefrinhidroklorür (%2,5) ve tropikamid (%0,5) göz damlaları topikal olarak uygulanmıştır.

- **Fundus Muayenesi ve Renkli Fundus Fotoğrafı Çekilmesi**

Tavşanlara yukarıda belirtildiği şekilde anestezi uygulamasının ve göz bebeklerinin dilate edilmesinin ardından fundus muayenesi yapılmış ve RFF çekilmiştir (Şekil 3.5.) (Envisu R2310; Bioptigen, SD-OCT; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Çekimlerde, tavşan gözüne özel Retina Lensi (Bioptigen, Envisu) kullanılmıştır. Fundus muayene bulguları, yeni damar oluşumunun gerileme paternine göre değerlendirilmiştir. Yeni damar oluşumunun gerileme paterninin derecelendirme skalası: (145)

Derece 1: Yeni damar oluşumunun tam gerilemesi

Derece 2: Yeni damar oluşumunun kısmi gerilemesi

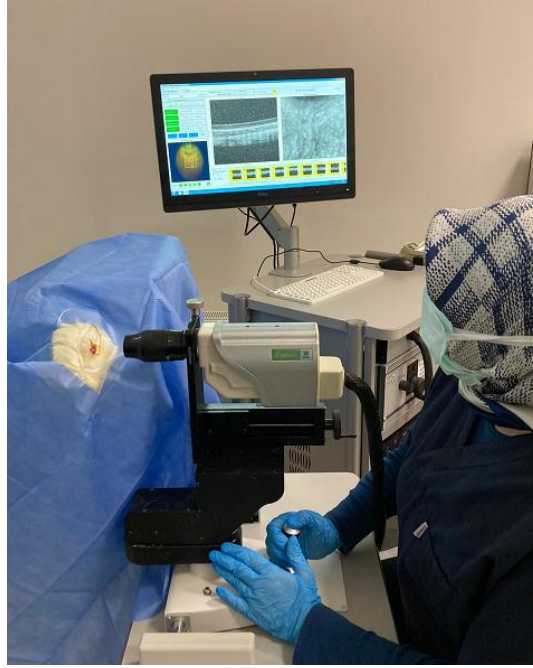
Derece 3: Yeni damar oluşumunda gerileme izlenmemesi

- **Optik Kohorens Tomografi**

OKT, retina dokularından yüksek çözünürlükte görüntü almaya imkan veren, tekrarlanabilir ve girişimsel olmayan bir görüntüleme tekniğidir. DRP'de maküla

tabakalarında ödem gelişimine bağlı olarak makülanın kalınlık ölçümleri artar. Tavşan gözünde tam bir maküla mevcut değildir, fakat insandaki maküla ile benzer özellikler gösteren, area santralis veya görsel çizgi (*visual streak*) olarak adlandırılan bölge mevcuttur. Area santralis, histolojik olarak retinanın diğer bölgelerinden farklı olmakla birlikte fundus muayenesinde fark edilmez. Tavşan gözlerinde retina hastalıklarının değerlendirildiği çalışmalarda area santralisten alınan OKT görüntüleri kullanılmaktadır (294-296). Çalışma kapsamında, tedaviye cevabın incelenmesinde, vasküler geçirgenlik parametresinin değerlendirilmesinde de maküla kalınlık ölçümlerindeki değişiklikler incelenmiştir (299). Tablo 3.4'te sunulmuş olan iş planına uygun olarak yapılan ölçümlerde elde edilen maküla kalınlık ölçümleri, istatistiksel olarak değerlendirilerek gruplar arasındaki farklar incelenmiştir.

OKT görüntüleri, spektral domain OKT (Envisu R2310; Biotigen, SD-OCT; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) cihazı ile çekilmiştir (Şekil 3.5.). Cihaz, 32.000 A-tarama hızına, 1,6 µ aksiyel çözünürlüğe sahip, tavşan gözüne özel üretilmiş bir OKT cihazıdır. Her bir çekim protokolü, area santralis merkez alan 12×12 and 6×6 mm hacim taramalarından oluşmaktadır. OKT taramaları, area santralis optik diskin inferiorunda yer alan merkezindeki alandan alınmıştır. Her bir çekim için area santralisin merkezi alanından alınan OKT kesitlerinde, optik disk sınırının 2, 3 ve 4 mm uzağından ve her üç noktada optik disk merkezi ve 1 mm sağ ve 1 mm soldan olmak üzere üçer noktadan maküla kalınlık ölçümü yapılmıştır ve sonuçlar veri çizelgesine kaydedilmiştir (295, 296).



Şekil 3.5. Tavşan gözünde RFF ve OKT çekimi.

- **Fundus Florosein Anjiyografi**

FFA incelemesinde temel prensip, intravenöz yolla sistemik dolaşıma uygulanan fluoreseinin, özel cihazlar yardımıyla görüntülenerek gözün damar yapısının incelenebilmesidir. Sağlıklı tavşanlarda sistemik dolaşım aracılığıyla retinaya gelen fluoresein KRB'den geçemeyeceğinden damar içinde kalır ve FFA incelemesinde sadece damarların içindeki fluoresein görülebilir. Diyabetik retinopati gibi KRB hasarı gelişmiş tavşanlarda ise bariyer fonksiyonu bozulduğundan damar geçirgenliği artar ve fluoresein damar dışına sızar (27). FFA incelemesinde damarların dışında, retina dokusunda ve vitreusta fluoresein sızıntısı görünür ve bu görüntü KRB hasarını gösterir. FFA görüntülerinin incelenmesinde damar dışına sızan fluoreseinin miktarı, KRB harabiyetinin ciddiyeti ile orantılıdır. FFA incelemeleri, Tablo 3.4.'de belirtilen ölçüm zamanlarında, dijital fundus kamara (Phoenix ICON™, Pleasanton, CA, USA) ile gerçekleştirilmiştir. FFA için 0,5 mL %10'luk sodyum fluoresein (Alcon, Worth, TX, USA) tavşanların marjinal kulak veninden verilmiş ve takibeden 5-6 dakikalık süreçte her 2-3 saniyede bir fotoğraflar alınmıştır.

FFA görüntüleri, retina damarlarından olan fluoresein sızıntısının miktarına göre aşağıda verildiği şekilde derecelendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek gruplar arasındaki farklar incelenmiştir (27, 297, 298).

Derece 1: Normal retina damar yapısı, retina damarlarında, intravasküler fluoreseinin görünümü

Derece 2: Hafif düzeyde fluoresein sızıntısı; optik disk ve retina damar yapısının izlenmesine izin veren fluoresein sızıntısı

Derece 3: Belirgin düzeyde fluoresein sızıntısı; optik disk ve retina damar yapısının kısmi olarak değerlendirilmesine izin veren fluoresein sızıntısı

Derece 4: Ciddi düzeyde fluoresein sızıntısı; optik disk ve retina damar yapısının değerlendirilmesine izin vermeyecek derecede fluoresein sızıntısı

- **Fundus Fluorofotometri**

FFFM incelemesinde temel prensip, KRB harabiyetinin, vitreustaki fluoresein konsantrasyon değişimine bağlı olarak değerlendirilmesidir. Diyabetik retinopatide gelişen KRB harabiyetinin derecesine bağlı olarak, vitreustaki fluoresein miktarı artarken, tedavi sonrası tekrar normal düzeyine yaklaşır (299). Fundus Fluorofotometri ölçümleri, Tablo 3.4'te gösterilen ölçüm zamanlarında 0,5mL %10'luk sodyum fluoresein (Alcon, Worth, TX, USA) tavşanların marjinal kulak veninden uygulanmasından 60 dk sonra Fluorotron Master (Ocumetrics, Mountain View, CA) cihazı kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 3.6.). Çalışma kapsamında önce FFA tetkikleri yapılmış, gerekli zaman aralığı geçtikten sonra FFFM ölçümleri yapılarak, tavşanlara 2. kez fluoresein verilmemiştir. Fluorofotometrik veriler, floresan birimlerinde sunulmuş ve retinadan korneaya optik eksen boyunca bir dizi farklı ölçümleri göstermiştir. Veriler Microsoft Excel'de çizilmiş ve eğri altındaki alan (AUC) ölçülmüştür (299). Her bölme için AUC, OriginPro yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Kan retina bariyer fonksiyonunun değerlendirilmesinde, parametre

olarak, vitreustaki fluoresein miktarının sağlıklı gözlerden alınan ölçümlere oranı dikkate alınmıştır (279).



Şekil 3.6. Tavşanlarda FFFM ölçümleri.

3.7.5. İstatistiksel Analiz

Altı farklı gruba ilişkin 4 bağımlı ölçüm düzeyinde DRP ve FFA dereceleri sıralı kategorik olarak değerlendirildiği için bu değişkenlerin zamana ve gruplara bağlı değişimi, uzunlamasına verilerde parametrik olmayan yöntem olan F1-LD-F1 tasarımları kullanılarak analiz edilmiştir. F1-LD-F1 tasarım için, örneklem büyüklüğü 200'den küçük olduğundan ANOVA tipi istatistik kullanılmıştır. Verinin özetlenmesinde marjinal görelî etkiler ve parametrik olmayan istatistikler kullanılmıştır. Marjinal görelî etki, bir gruptan/bir zamanda seçilen rasgele bir gözlemin zaman ya da gruptan bağımsız rasgele seçilen bir gözlemden gözlem değerinin yüksek olma olasılığıdır. DRP ve FFA değişkenleri için, her bir grupta zamanlar arasındaki ikili farklılıklar LD-F1 tasarımlarla test edilmiştir. Her bir zamanda gruplar arası farklılık ise Jonckheere-Terpstra testi ile değerlendirilmiştir. F1-LD-F1 tasarımlar için analizler R yazılımındaki “nparLD” kütüphanesi kullanılarak elde edilmiştir (300).

FFFM değişkeni için 1.ölçüme göre diğer ölçümlerin artış düzeyleri yüzdeler olarak hesaplanmış, her bir grup için 1.ölçüme göre hesaplanan yüzdelik değişim eğrilerinin en iyi uyum gösterdiği eğri, eğri kestirim yöntemi ile belirlenmiştir. Bu eğriler içinden en fazla değişim gösteren eğri ise uyum iyiliği istatistiklerinden biri olan Kolmogorov-Smirnov test istatistiği ile belirlenmiştir. OKT değişkeni için her bir

ölçümle diğer ölçümler arasındaki farklarının değerlendirilmesinde Wilcoxon test istatistiği kullanılmıştır. GIB ölçümlerinin her bir grupta zamana bağlı değişimleri Friedman test istatistiği ile değerlendirilmiştir. FFFM, OKT ve GIB değişkenlerine ilişkin hipotezleri test etmede ise SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır (301). Tüm ikili karşılaştırmaları yorumlamak için Bonferroni düzeltmeli p değerleri kullanılmıştır. İstatistiksel hipotezleri test etmek için Tip-I hata düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

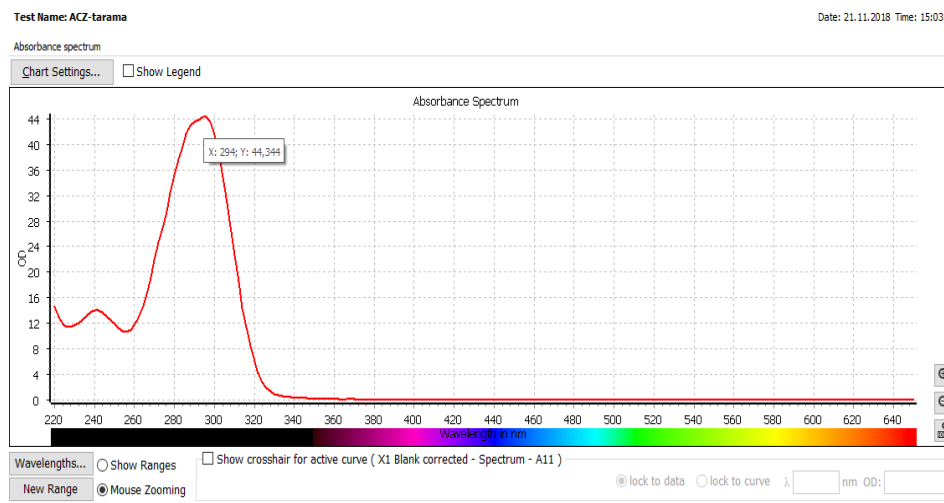
Tez çalışmasına ilişkin bulgular dört ana başlık altında aşağıda özetlenmiştir,

- i) Analitik yöntem geliştirilmesi ve yöntem validasyon çalışmaları
- ii) Asetazolamid yüklü nanopartiküler sistemlerin hazırlanması, karakterizasyonu ve salım çalışmaları,
- iii) Geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vitro* sitotoksitesi ve etkinliğinin incelenmesi
- iv) Geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vivo* toksisitesi ve etkinliğinin incelenmesi.

4.1. Asetazolamid için Miktar Tayini Yöntemi ve Yöntem Validasyonu

• Asetazolamid'in Ultraviyole (UV) Spektrumu

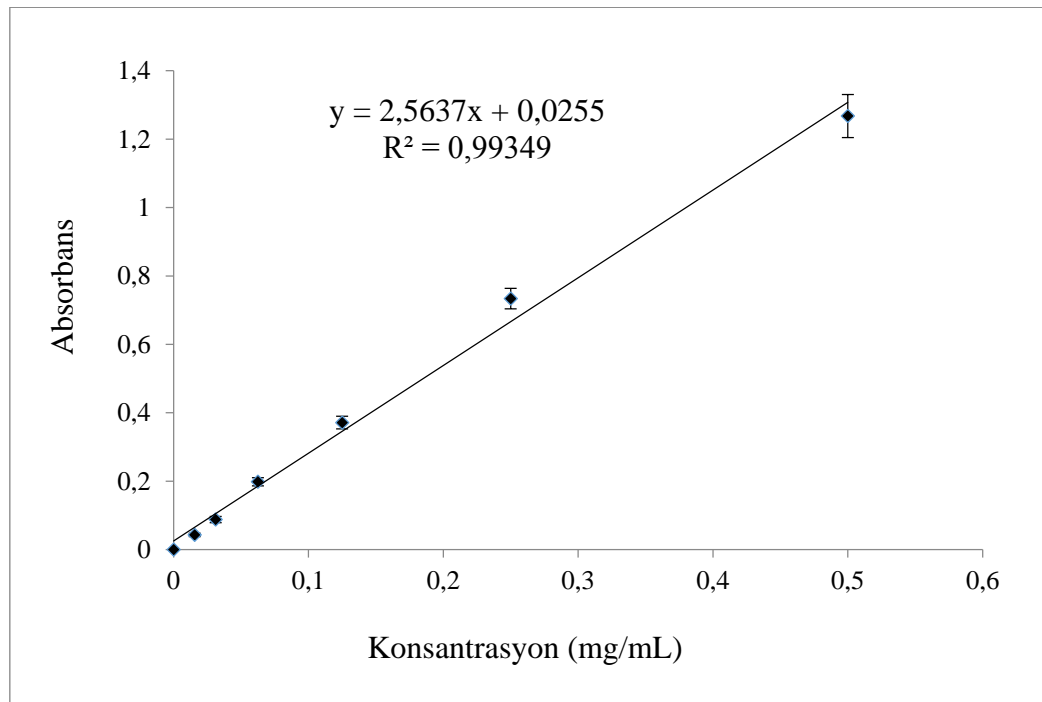
Etkin madde yükleme ve salım çalışmalarında ACZ'nin miktar tayini ve işlem etkinliği için, 0,5 mg ACZ'nin 0,1M NH₄OH/PBS içerisinde çözeltisi hazırlanarak 200-1000 nm dalga boyu aralığında spektrumları alınmış ve maksimum absorbans verdiği dalga boyu 294 nm olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Asetazolamidin (0,5mg/mL) 0,1M NH₄OH/PBS içerisinde hazırlanan çözeltisinin 220-600 nm dalga boyları aralığında UV spektrumu.

- Doğrusallık (*Linearity*)

Salım çalışmalarında kullanılmak üzere ACZ'nin standart kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Bu amaçla Bölüm 3.4.2.'de belirtildiği şekilde ACZ stok çözeltisinden hareketle seri seyreltme yapılarak çözelti serileri hazırlanmış ve 294 nm'de absorbansları tayin edilmiştir. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek regresyon analizi ile kalibrasyon denklemi ve doğrusu elde edilmiştir. ACZ'nin 0,1M NH₄OH çözeltisi ile yapılmış olan spektrofotometrik miktar tayini yöntemine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2.'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. ACZ'nin 0,1M NH₄OH/PBS çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi ($\lambda_{\max}=294$ nm; $\bar{X} \pm SS$: n=3).

Elde edilen kalibrasyon doğrusu ile, 0,0156-0,5 mg/mL konsantrasyon aralığında konsantrasyon ile absorbans arasındaki ilişkinin doğrusallığı determinasyon katsayısının 1'e yakın olmasıyla kanıtlanmıştır ($R^2=0,99349$; y-intersept= 0,0255; eğim=2,5637).

- **Doğruluk (Accuracy)**

ACZ miktar tayini yönteminin doğruluğunu göstermek için Bölüm 3.1.'de anlatıldığı gibi ACZ'nin 3 farklı çözelti serisi üzerinden yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de sunulmuştur. Geri kazanım analizlerde sırasıyla %101,05; %100,82 ve %101,06 olarak bulunmuştur. % Bağıl Standart Sapma ise analizlerde %1,5'ten düşük bulunmuştur.

Tablo 4.1. ACZ miktar tayini için gün içi doğruluk sonuçları ($\bar{X} \pm SS$; n=6).

Eklenen Konsantrasyon (mg/mL)	Tayin Edilen Konsantrasyon (mg/mL)	% Geri Kazanım	% Bağıl Standart Sapma
0,0156	0,016 \pm 0,0005	101,06 \pm 3,2	1,07
0,125	0,126 \pm 0,00263	100,82 \pm 2,1	0,82
0,5	0,505 \pm 0,01125	101,05 \pm 2,24	1,05

\bar{X} : Ortalama, SS: Standart sapma

- **Kesinlik (Precision)**

ACZ miktar tayin yönteminin gün içi ve günler arası kesinliğini göstermek için Bölüm 3.2'de anlatıldığı gibi ACZ'nin 3 farklı konsantrasyonda çözelti serileri üzerinden yapılan analizlerden elde edilen sonuçlar Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'de sunulmuştur. % Bağıl Standart Sapma gün içi ve günler arası analizlerde %1,5'ten düşük bulunmuştur.

Tablo 4.2. ACZ miktar tayin yönteminin gün içi kesinlik sonuçları (n=6).

Eklenen Konsantrasyon (mg/mL)	Tayin Edilen Konsantrasyon (mg/mL) ($\bar{X} \pm SS$)*	Bağıl Standart Sapma (%)
0,0156	0,0133 \pm 0,0001	0,85
0,125	0,1207 \pm 0,0014	1,17
0,5	0,4970 \pm 0,0047	0,95

\bar{X} : Ortalama, SS: Standart sapma

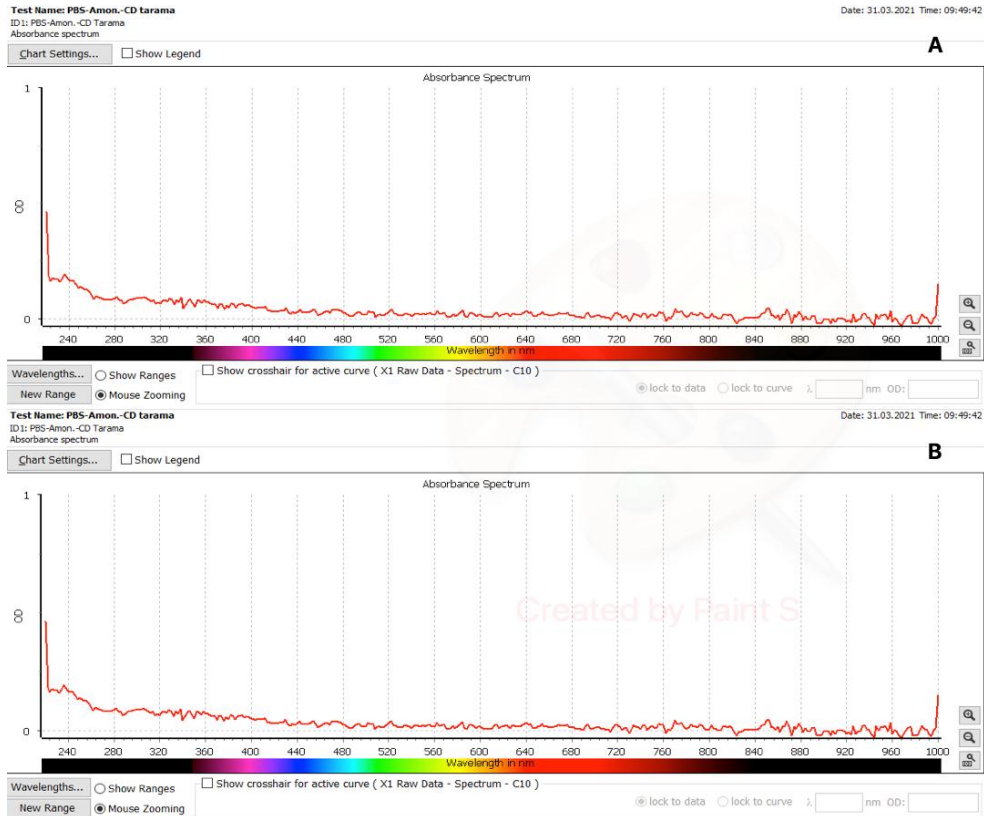
Tablo 4.3. ACZ miktar tayin yönteminin günler arası kesinlik sonuçları (n=6).

Eklenen Konsantrasyon (mg/mL)	Tayin Edilen Konsantrasyon (mg/mL) ($\bar{X} \pm SS$)*	Bağıl Standart Sapma (%)
0,0156	0,0137 \pm 0,0003	1,3
0,125	0,123 \pm 0,0016	1,26
0,5	0,498 \pm 0,0006	0,11

\bar{X} : Ortalama, SS: Standart sapma

• Özgüllük (Specificity)

ACZ ölçüm yönteminin özgüllüğünü göstermek için bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı gibi etkin madde içermeyen salım ortamının (PBS-NH₄OH-Lizozim) ve nanopartiküllerin hazırlandığı CD içeren salım ortamının (PBS-NH₄OH-Lizozim-CD) absorbans taraması yapılmış, ve ACZ'nin pik verdiği 294 nm dalga boyunda pik saptanmamıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Etkin madde içermeyen salım ortamının (A) ve CD içeren salım ortamının (B) UV spektrumları.

- **Dayanıklılık (Stability)**

Nanopartiküllerin kullanımında ve analizinde yaşanabilecek gecikmeler göz önüne alınarak, ACZ’de beklemeye karşı meydana gelecek absorbands değişimlerini belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.2.’de anlatıldığı gibi dayanıklılık (stabilite) çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4.’te sunulmuştur. % Bağıl Standart Sapma tüm analizlerde %2’den düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, ACZ’in nanopartiküllere yüklendiği ve analiz edildiği süre boyunca dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.4. ACZ’nin miktar tayin yöntemi için stabilite test sonuçları ($\bar{X} \pm SS$; n=6).

Eklenen Konsantrasyon (mg/mL)	Zaman (saat)	Tayin Edilen Konsantrasyon (mg/mL)	Bağıl Standart Sapma (%)
0,0156	0	0,0151 ± 0,0038	1,44
	6	0,0152 ± 0,0007	
	12	0,0153 ± 0,0009	
	24	0,0153 ± 0,0007	
	48	0,0157 ± 0,0008	
	72	0,0156 ± 0,0002	
	96	0,0155 ± 0,0020	
0,125	0	0,126 ± 0,007	1,42
	6	0,122 ± 0,0011	
	12	0,121 ± 0,0006	
	24	0,124 ± 0,0009	
	48	0,121 ± 0,0004	
	72	0,123 ± 0,0006	
	96	0,125 ± 0,0042	
0,5	0	0,505 ± 0,0088	0,83
	6	0,497 ± 0,0014	
	12	0,495 ± 0,0015	
	24	0,495 ± 0,0011	
	48	0,496 ± 0,0010	
	72	0,496 ± 0,0008	
	96	0,502 ± 0,0046	

\bar{X} : Ortalama, SS: Standart sapma

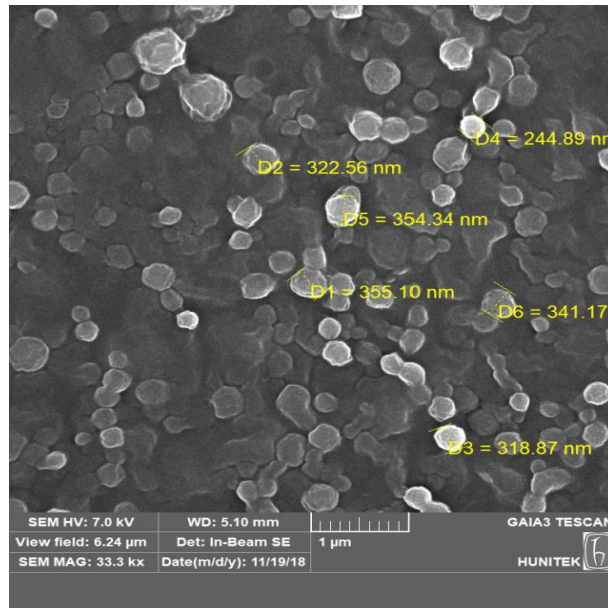
4.2. Asetazolamid Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu ve Salım Çalışmalarının Yapılması

4.2.1. ACZ-PHBV ve ACZ-CD Nanopartiküllerin Geliştirilmesi

Tez kapsamında boyut, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve yükleme verimi açısından göz uygulamaları için en uygun olan nanopartikülü hazırlamak için farklı seçenekler denenmiştir. Bu amaçla, iki farklı polimer (PHBV ve CD) kullanılmıştır. CD bazlı nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesinde en uygun yöntemi belirlemek amacıyla 4 farklı hazırlama yöntemi ile farklı formülasyonlar denenmiş ve içlerinden tez amacına en uygun formülasyon seçilmiştir.

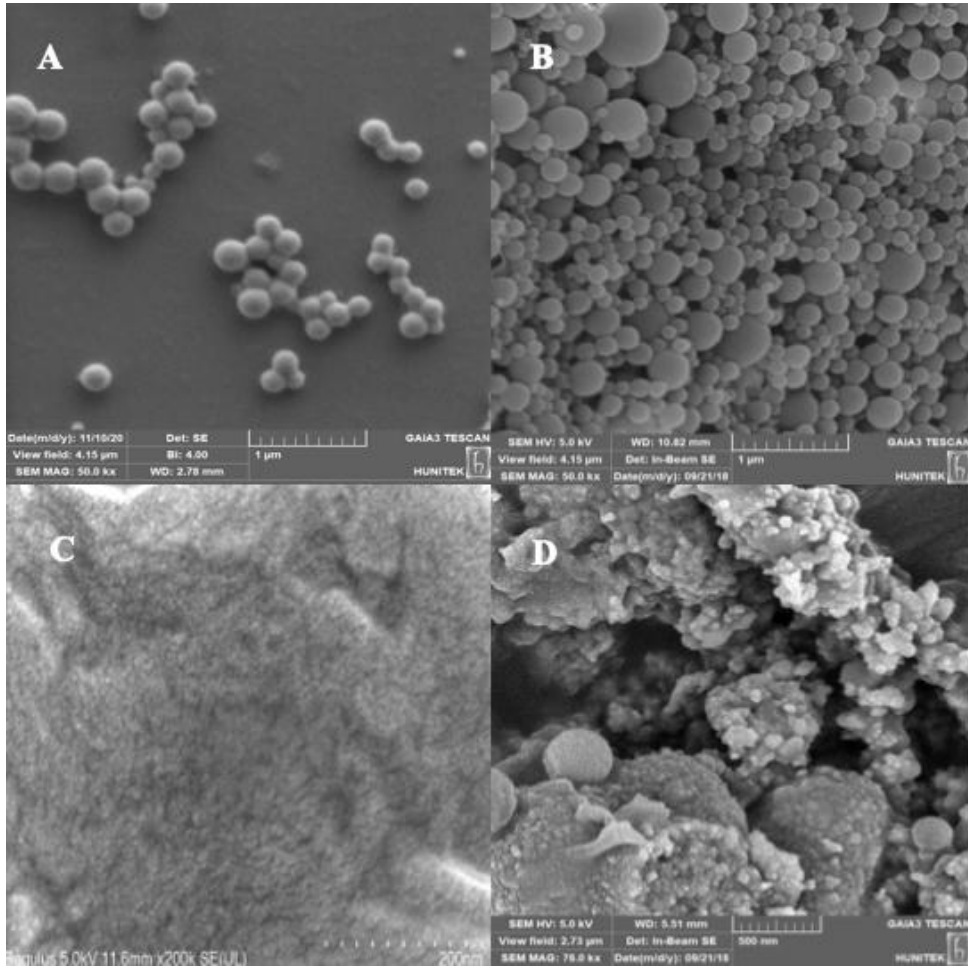
• Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat (PHBV) Nanopartiküllerin Geliştirilmesi

Hazırlanan PHBV nanopartiküllerin, SEM incelemelerinde 342 ± 5.359 nm boyutlarında, %49,41 yükleme verimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). Hazırlanan ACZ-PHBV nanopartiküler sistem, tez kapsamında amaçlanan yükleme oranını karşılayamadığı için CD bazlı nanopartiküler sistemlerin geliştirilmesi planlanmıştır.



Şekil 4.4. Geliştirilen ACZ-PHBV nanopartiküllerin SEM görüntüsü.

Tez kapsamında, CD nanopartiküllerin geliştirilmesinde ve optimizasyonunda dört farklı yöntem kullanılmıştır (Tablo 4.5.). Farklı yöntemlerle geliştirilen siklodekstrin nanopartiküllerin SEM incelemeleri yapılarak boyutları incelenmiştir (Şekil 4.5.). DLS yönteminde parametre değişikliklerinin ortalama nanopartikül çapına ve verimliliğine etkisi incelenmiştir.



Şekil 4.5. Farklı yöntemlerle geliştirilen (A: Yöntem 1, B: Yöntem 2, C: Yöntem 3, D:Yöntem 4) siklodekstrin nanopartiküllerinin SEM görüntüsü.

Tablo 4.5. Geliştirilen NP'lerin boyut dağılımları, polidispersite indeksleri (PDI) ve zeta potansiyel değerleri ($\bar{X} \pm SS$; n=3).

Nanopartikül	Yöntem	Polimer /Etkin Madde	Boyut (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)
PHBV NP	Çift emülsiyon çözücü buharlaştırma	PHBV	342 ± 5.359	0,254 ± 0,013	-18,7±0.627
CD NP	Yöntem 1	2HP-β-CD	195,1±5,05	0,193±0,02	-9.73±1,19
	Yöntem 2	2HP-β-CD	513,8±17,3	0,421±0,089	-25.2±0.4
	Yöntem 3	2HP-β-CD	1760±59	0,6±0,1	-34.7±0,6
	Yöntem 4	γ CD	662,2±24,2	0,531±0,035	-19,9±1,5
	Yöntem 1*	2HP-β-CD/ACZ	238±16	0,16±0,018	-16,8±3.94

*optimum siklodekstrin hazırlama yöntemi; PHBV: Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat; ACZ: asetazolamid 2HP-β-CD: hidroksipropil-β-siklodekstrin; γCD: Gama Siklodekstrin

Dört farklı yöntem kullanılarak hazırlanan siklodekstrin nanopartiküller incelendiğinde hem boyut olarak hem de yükleme verimi açısından Yöntem 1 ile hazırlanan nanopartiküllerin tez öneri amaçlarını karşıladığı görülmektedir. Bu nedenle ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküllerin hazırlanmasında Yöntem 1 kullanılarak geliştirilen nanopartiküller kullanılmıştır.

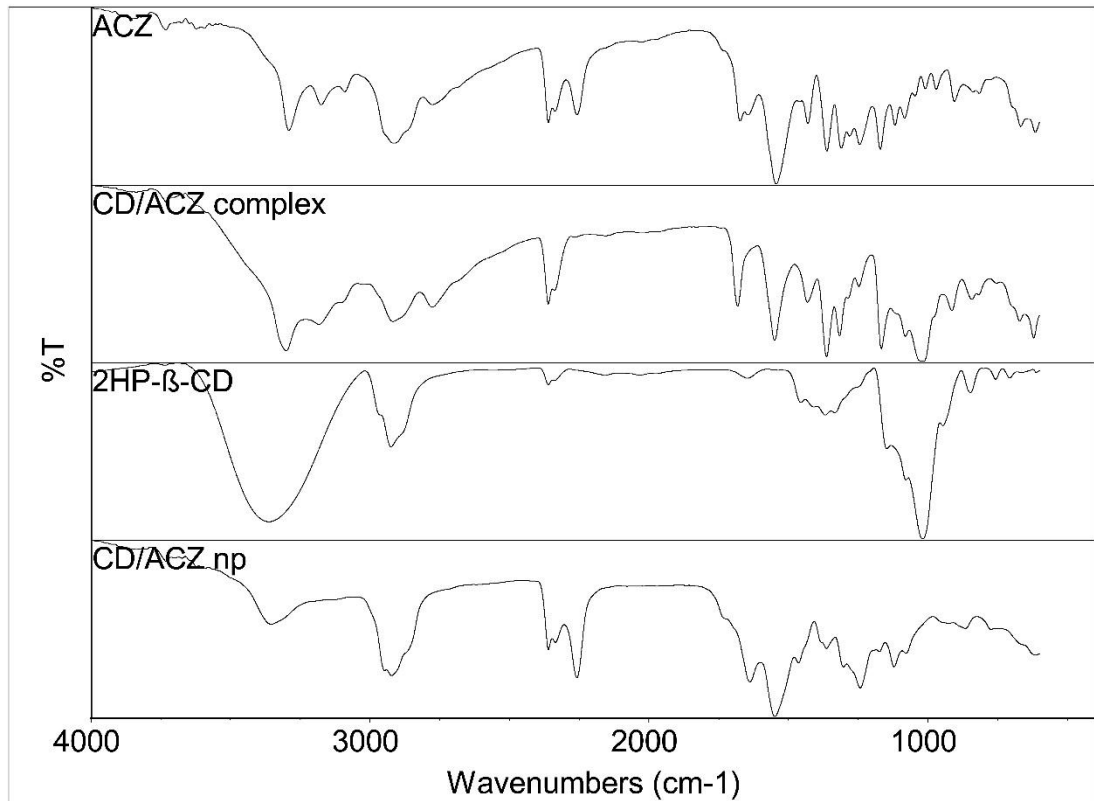
4.2.2. ACZ-CD ve CD Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Geliştirilen nanopartiküllerin fiziksel özellikleri taramalı elektron mikroskopisi (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile kimyasal yapısı fourier dönüşümü kızılötesi spektrometresi (FTIR, Nicolet TM ISTM 50 spektrometresi, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ve polidispersite indeksi analizleri Zeta Sizer cihazı (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, Malvern, İngiltere) ile gerçekleştirilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

• FTIR Analizi

Geliştirilen asetazolamid yüklü 2HP-β-CD nanopartiküllerin (ACZ-CD-NP'lerin) moleküler bağ karakterizasyonunu değerlendirmek için kızılötesi spektroskopisi (IR) yöntemi kullanılmıştır. ACZ, CD-NP ve ACZ-CD-NP'lerin 4000-600 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki FTIR spektrumları Şekil 4.6.'da verilmiştir.

ACZ-CD-NP'lerin FTIR spektrumunda, 1622 cm^{-1} (C=O) ve 1384 cm^{-1} (-CH₃) dalga boylarında karakteristik pikler gözlemlenmiştir. Bu pikler, ACZ-CD-NP'lerin yapısında bulunan ACZ'den kaynaklanmaktadır. 1084 cm^{-1} ve 1017 cm^{-1} dalga boylarında gözlenen pikler sırasıyla 2HP- β -CD yapısındaki C-O ve C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1652 cm^{-1} 'deki pik ise CD yapısındaki H-O-H gerilme titreşimine bağlıdır. 2925 cm^{-1} 'deki baskın absorpsiyon, C-H simetrik ve asimetric gerilmesinin göstergesidir. 3350 cm^{-1} 'deki geniş bant ise 2HP- β -CD yapısında bulunan O-H gerilmesine karşılık gelmektedir (266). Elde edilen karakteristik pikler literatür ile uyumludur (283).



Şekil 4.6. ACZ, CD/ACZ kompleks, CD ve ACZ-CD-NP'lerin FTIR spektrumları (CD-NP: etken madde içermeyen boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül; FTIR: fourier dönüşümü kızılötesi spektrometresi)

- **Dinamik Işık Saçılımı (DLS)**

Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan ACZ-CD-NP'lerin DLS yöntemi ile tayin edilen partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel dağılım profilleri Şekil 4.7.'de

sunulmuştur. Hazırlanan ACZ-CD-NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü 238 ± 16 nm, zeta potansiyeli $-16,8 \pm 3,94$ mV ve PDI değeri $0,16 \pm 0,018$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.5.).

Sample Details

Sample Name: 20201104 CD NP DW 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

A

File Name: musteridosyasi.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 208

Dispersant RI: 1,330

Material RI: 1,52

Viscosity (cP): 0,8872

Material Absorbtion: 0,010

Measurement Date and Time: 4 Kasım 2020 Çarşamba 16:1...

System

Temperature (°C): 25,0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 372,1

Measurement Position (mm): 5,50

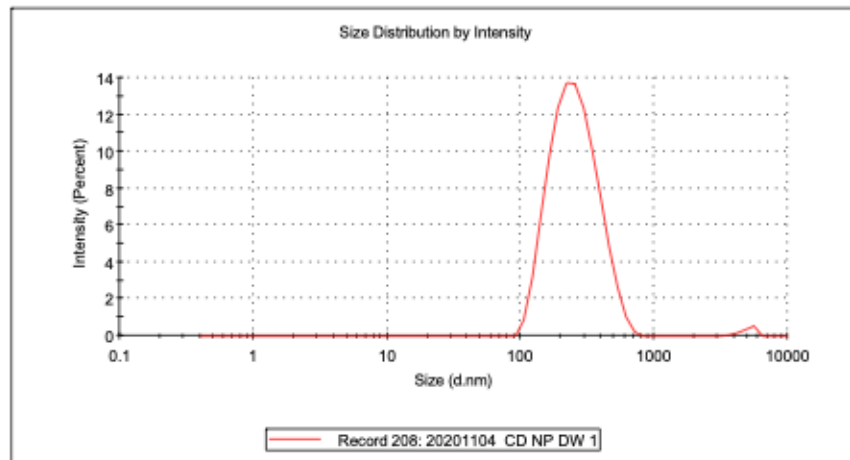
Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 5

Results

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.n...)
Z-Average (d.nm): 238,0	Peak 1: 266,8	98,9	106,6
Pdl: 0,160	Peak 2: 5010	1,1	602,9
Intercept: 0,939	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality : **Good**



Sample Details

Sample Name: 20201104 ACZ CD NP DW 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

B

File Name: musteridosyasi.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 214

Dispersant RI: 1,330

Date and Time: 4 Kasım 2020 Çarşamba 16:28:27

Viscosity (cP): 0,8872

Dispersant Dielectric Constant: 78,5

System

Temperature (°C): 25,0

Zeta Runs: 12

Count Rate (kcps): 201,5

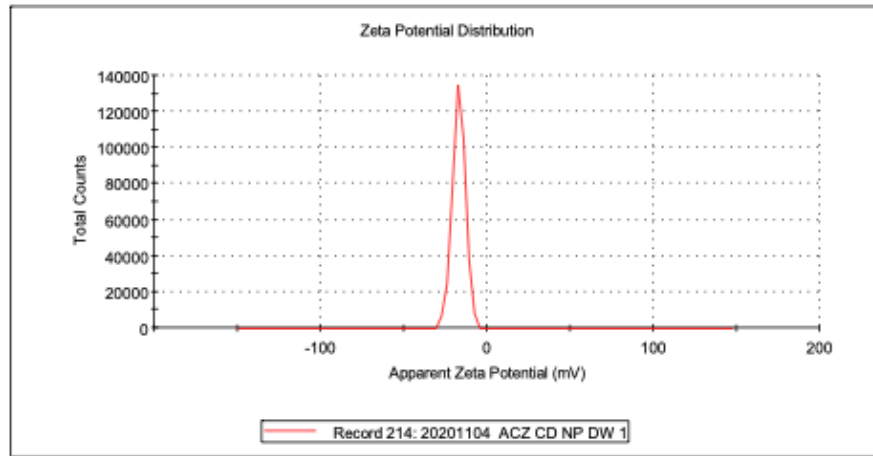
Measurement Position (mm): 2,00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 2

Results

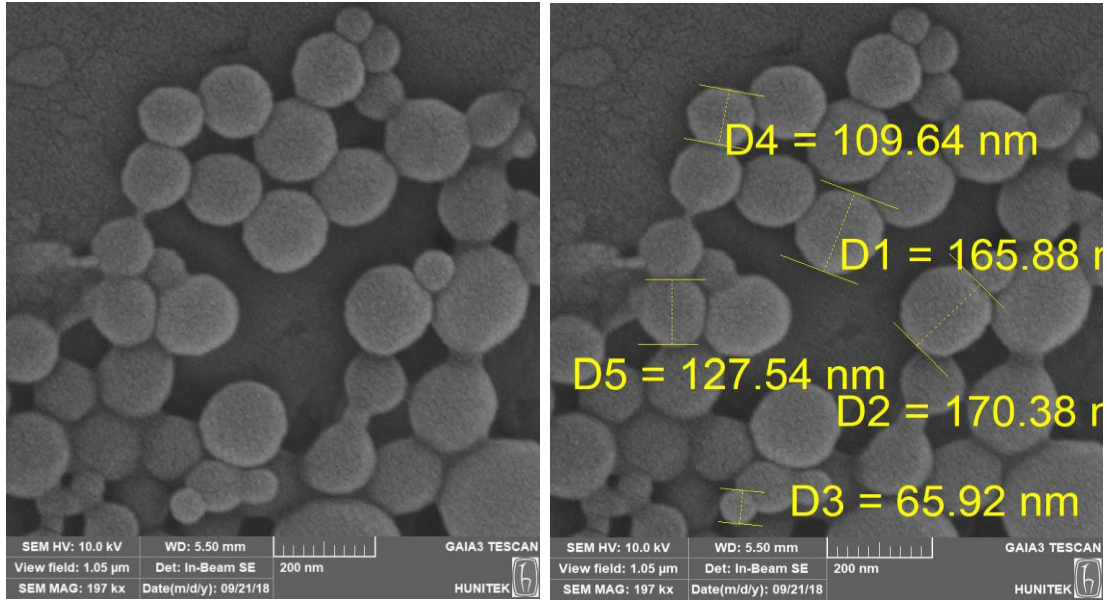
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -16,8	Peak 1: -16,8	100,0	3,94
Zeta Deviation (mV): 3,94	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0160	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality : Good			



Şekil 4.7. ACZ-CD-NP'lerin partikül büyüklüğü dağılımı (A) ve zeta potansiyel (B) sonuçları.

- **SEM Analizleri**

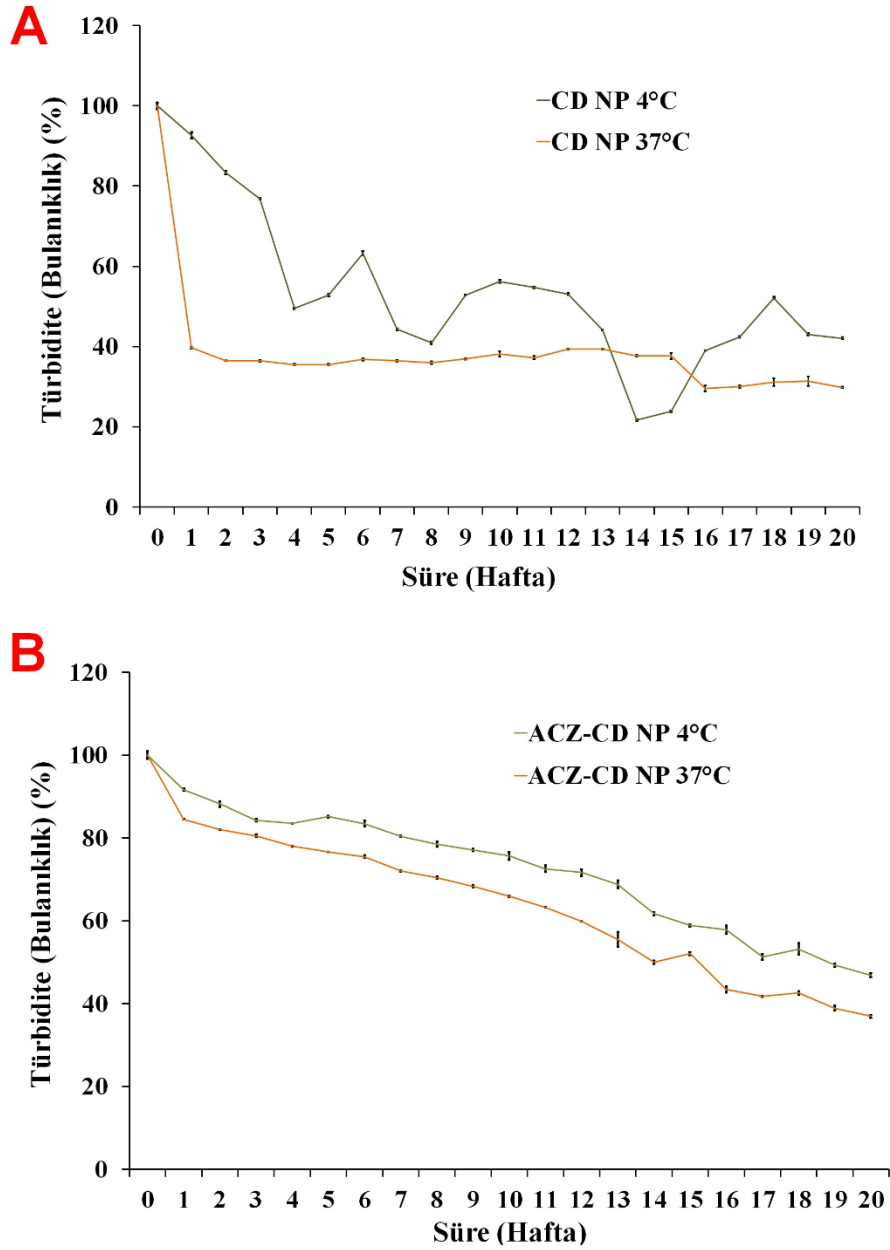
Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan ACZ-CD-NP'lerin morfolojik özellikleri ve ortalama partikül büyüklüğü SEM ile tayin edilmiştir (Şekil 4.8.). SEM görüntüleri incelendiğinde, ACZ-CD-NP'lerin düzgün yüzeyli ve küresel formda olduğu, ortalama partikül büyüklüklerinin yaklaşık 130 ile 170 nm civarında olduğu görülmektedir.



Şekil 4.8. Yöntem 1 ile hazırlanan ACZ-CD-NP'lerin SEM görüntüleri.

4.2.3. Nanopartiküllerin Stabilitesinin/Degradasyon Süresinin Belirlenmesi

Degradasyon çalışmaları 4°C ve 37°C (Şekil 4.8.) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve her ölçüm üç kez tekrar edilmiştir. Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi, sıcaklık arttıkça nanopartiküllerin degradasyon oranı artmıştır. Aynı zamanda yapıda asetazolamid etkin maddesinin varlığı daha stabil bir degradasyon oluşmasını sağlamıştır. CD nanopartiküllerin 4°C'deki degradasyon grafiğinde belirli zamanlarda artmalar meydana gelmiştir. Bu durum degradasyon ürünlerinin agregasyonu ile açıklanmaktadır.

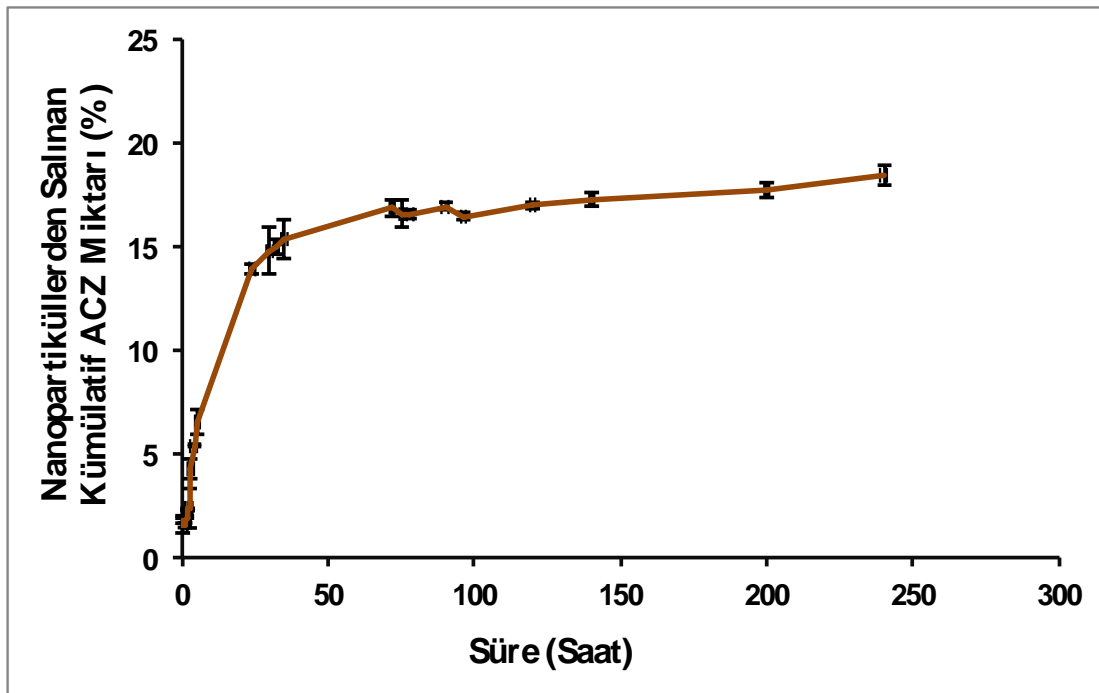


Şekil 4.9. CD-NP'lerin (A) ve ACZ-CD-NP'lerin (B) degradasyon profilleri ($\bar{X} \pm SS$; $n=3$). (CD NP: etkin madde içermeyen boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ-CD NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül)

4.2.4. Siklodekstrin Nanopartiküllere Asetazolamid Yükleme Oranının ve Salım Profilinin Belirlenmesi

Hazırlanan siklodekstrin nanopartiküllere ACZ yükleme verimliliğinin (YV%) belirlenmesi için, nanopartiküllerin hazırlanmasından sonra dış fazda (süpernatant) kalan yüklenmemiş ve yıkama sularındaki ACZ'nin başlangıçta eklenen ACZ miktarından çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. ACZ etkin maddesinin siklodekstrin nanopartiküllere yükleme oranı %50 olarak tayin edilmiştir.

Nanopartiküllerden salınan ACZ'nin belirlenmesi için Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır. Bölüm 3.5.4.'te belirtildiği gibi gerçekleştirilen salım çalışmalarında belirli zaman aralıklarında alıcı bölmeden alınan numunelerin absorbans değerleri 294 nm'de ölçülerek kalibrasyon doğrusu aracılığıyla ACZ miktarı hesaplanmıştır. ACZ yüklü optimum siklodekstrin nanopartiküllerin salım profili, Şekil 4.10.'da sunulmuştur.



Şekil 4.10. ACZ-CD nanopartiküllerinin PBS (pH 7,4) ortamında in vitro salım profili ($\bar{X} \pm SS$; n=3) (ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül).

4.3. Geliştirilen Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemin Etkinlik ve Güvenilirliğinin *In Vitro* Değerlendirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında HRMEC hücre hattında DRP hastalık modeli geliştirilmiş ve geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin *in vitro* sitotoksosite ve etkinlik değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.3.1. CD Nanopartiküllerin İnsan Retinal Mikrovasküler Endotel Hücre Hattı (HRMEC) Üzerine Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan serbest ACZ, etkin madde içermeyen boş CD-NP, ve ACZ-CD-NP'lerin HRMEC'e sitotoksik olup olmadıkları ve sitotoksosite oranlarının belirlenmeleri için MTT testleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.6.).

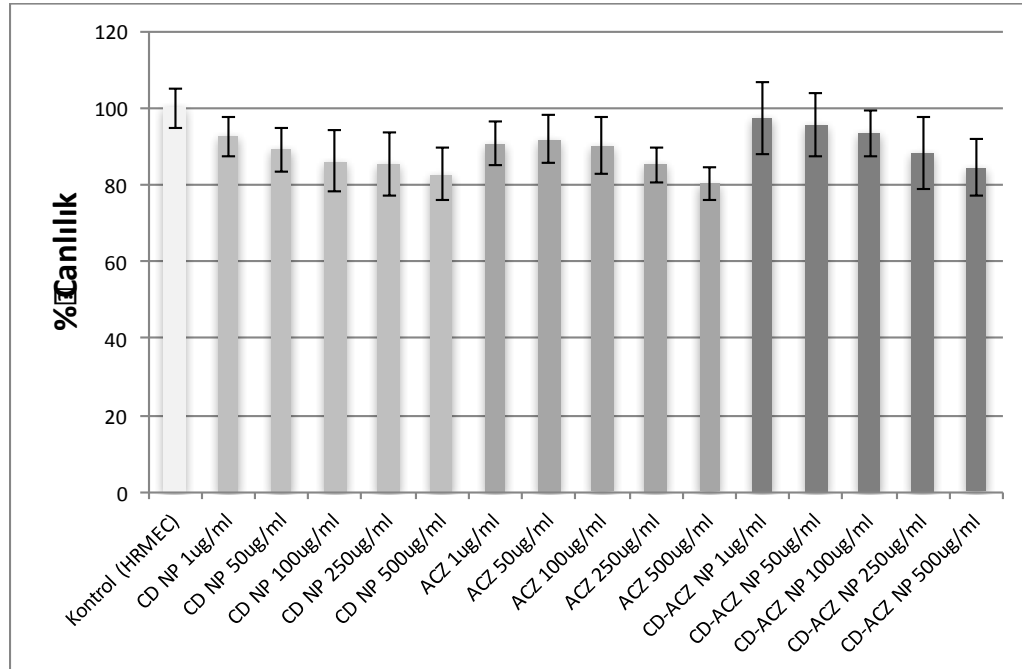
Sonuçlar karşılaştırıldığında konsantrasyon arttıkça nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksitesi de artmaktadır. 250 µg/mL konsantrasyonda hücreler yaklaşık %90 canlılık göstermektedirler. ACZ tedavi edici doz olarak 0,5 mg kullanılmaktadır. ACZ için terapötik doz olarak belirlenen 500 µg/mL konsantrasyonda etkin maddeye maruz bırakıldığında, hücreler %80 canlılık göstermektedir. ACZ'in nanopartiküllere yüklenmesi toksisitesini azaltmaktadır. Bu da bize nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin oldukça düşük olduğunu ve *in vivo* uygulamalar açısından uygun olduğunu göstermektedir (Şekil 4.11.).

Tablo 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki serbest ACZ, CD-NP ve ACZ-CD-NP nanopartiküllerin HRMEC üzerine sitotoksik etkileri.

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Canlılık (%)	SS*
Kontrol		100,00	5,13
ACZ	1	92,49	5,25
	50	89,19	5,61
	100	86,15	7,95
	250	85,25	8,19
	500	82,63	6,90
CD-NP	1	90,65	5,68
	50	91,86	6,12
	100	90,12	7,57
	250	85,12	4,36
	500	80,42	4,27
ACZ-CD-NP	1	97,34	9,39
	50	95,48	8,30
	100	93,44	5,90
	250	88,19	9,35
	500	84,29	7,40

*SS: standart sapma

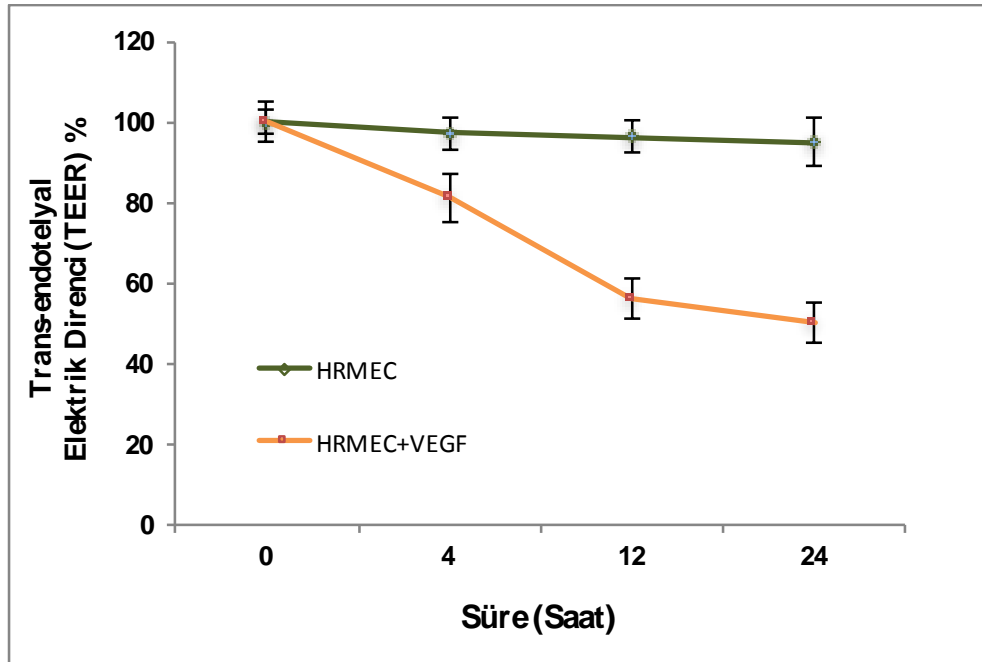
CD NP: etkin madde yüklü olmayan boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül.



Şekil 4.11. Farklı konsantrasyonlardaki ACZ, CD NP ve ACZ-CD NP HRMEC hücreleri üzerine sitotoksik etkileri ($\bar{X} \pm SS$; n=3) (CD NP: etkin madde yüklü olmayan boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül; HRMEC: insan retina mikrovasküler endotel hücre hattı).

4.3.2. HRMEC Hücre Kültüründe Diyabetik Retinopati (DRP) Modelinin Oluşturulması

DRP'de KRB'nin bariyer fonksiyonu bozulduğundan, TEER ölçümleri sonucunda elde edilen rezistans değerlerinde bir azalma beklenir (266). HRMEC hücre hattında diyabetik retinopati modeli oluşturulduktan sonra hücre bütünlüğü TEER ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin TEER değeri sabit kalırken, VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin TEER değerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.12.). Bu düşüş hücre bütünlüğünün bozulduğunu ve *in vitro* hücre kültüründe DRP modelinin oluşturulduğunu göstergesi olarak alınmıştır.



Şekil 4.12. VEGF içeren ve içermeyen besiyerinde inkübe edilen HRMEC hücrelerinin TEER değeri değişimleri ($\bar{X} \pm SS$; n=3) (HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; TEER: Transepitelial/endothelial elektriksel direnç).

Gruplar arası karşılaştırma Anova/Tukey testi ile yapılmıştır. Çalışmada VEGF verilen gruba ait TEER değerleri incelendiğinde zamana bağlı olarak TEER sonuçlarının azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$). VEGF verilmeyen grup ile VEGF verilen grup karşılaştırıldığında zamana bağlı olarak TEER değerleri arasında anlamlı farkın olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). VEGF verilmeyen hücrelerin TEER sonuçları arasında zamana bağlı olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ($p < 0,05$) (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. TEER ölçümleri yapılan 2 grubun (HRMEC ve VEGF ile etkileştirilen HRMEC) çalışma süresince 0., 4., 12. ve 24. saat ölçüm zamanlarında Evom2 ile ölçülen TEER değerlerinin (ohm.cm²) ortalama, standart sapma, standart hata ve medyan değerleri.

	0	4	12	24
HRMEC				
Ortalama	80	78	77	76
Standart Hata	2,89	2,31	2,31	3,46
Ortanca	80	78	77	76
Standart Sapma	5	4	4	6
Örnek Varyansı	25	16	16	36
Minimum	75	74	73	70
Maksimum	85	82	81	82
HRMEC+VEGF				
Ortalama	80	65	45	40
Standart Hata	1,73	3,46	2,89	2,89
Ortanca	80	65	45	40
Standart Sapma	3	6	5	5
Örnek Varyansı	9	36	25	25
Minimum	77	59	40	35
Maksimum	83	71	50	45

4.3.3. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin *in vitro* DRP Modelinde TEER Testleri ile Belirlenmesi

DRP hastalık modeli oluşturulan HRMEC’de, etkinmadde içermeyen boş CD-NP, serbest ACZ ve ACZ-CD NP uygulamalarının tedavi edici etkisinin TEER değeri ölçümü sonuçlarına göre değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Tablo 4.8. ve Şekil 4.13.’de sunulmuştur.

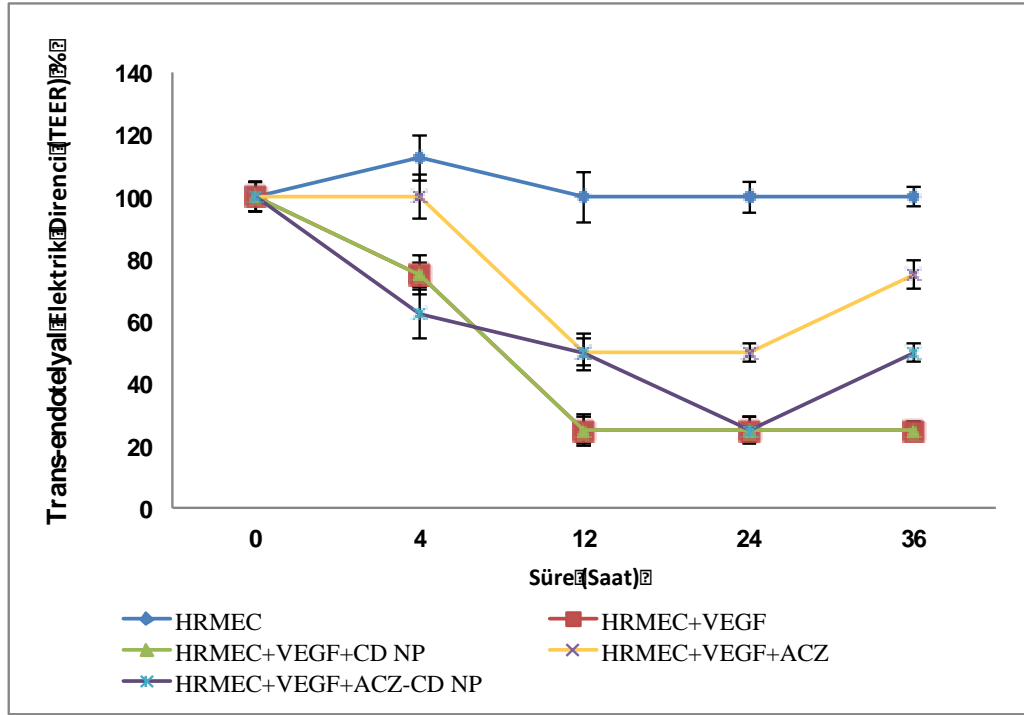
Kontrol grubu insertlerindeki hücrelerden elde edilen TEER değerleri belirli bir azalma göstermekle birlikte stabil kalmaya devam etmiştir. VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen insertlerde bulunan hücrelerin TEER değerinde zamana bağlı olarak bir azalma meydana gelmektedir. DRP modelinde ortamda bulunan VEGF’in hücre yüzeyine zarar vermesi sonucu beklenen bir durumdur (Şekil 4.12.). ACZ ve ACZ-CD nanopartiküllerin eklendiği insertlerdeki hücrelerin TEER değeri başlangıçta VEGF varlığına bağlı olarak azalma gösterirken, ortama nanopartikül ve ACZ’nin eklenmesi ile birlikte TEER değerinde belirgin bir artış görülmüştür. Nanopartiküllere yüklenen asetazolamidin ortama salınımı ile birlikte VEGF’in etkisi azalmakta ve *in vitro* olarak hücresel düzeyde bir tedavi görülmektedir (Şekil 4.12.).

Tablo 4.8. Kontrol grubu ve VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelerde tayin edilen TEER değerleri. 24. saatten sonra insertlere etkin madde içermeyen boş CD-NP serbest asetazolamid ve ACZ-CD nanopartikül eklenmiştir.

Hücre	Zaman (Saat)				
	0	4	12	24*	36
HRMEC	100±5	112,5±7,3	100±8,2	100±5,1	100±3,4
HRMEC+VEGF	100±5	75±6,5	25±4,3	25±4	25±3
HRMEC+VEGF+CD NP	100±5	75±4	25±5	25±4,5	25±2,5
HRMEC+VEGF+ACZ	100±5	100±7,2	50±4,5	50±3	75±4,5
HRMEC+VEGF+ACZ-CD NP	100±5	62,5±8	50±6	25±4	50±3

(*)Nanopartiküller ve serbest ACZ insertlere eklenmesi

HRMEC:İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; CD NP: etkin madde içermeyen boş siklodektrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP:Asetazolamid yüklü siklodektrin nanopartikül



Şekil 4.13. Kontrol grubu ve VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin TEER değerlerinin zamana bağlı olarak değişimi ($\bar{X} \pm SS$; n=3) (HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; CD: etkin madde içermeyen boş siklodektrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodektrin nanopartikül).

4.3.4. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Etkinliğinin *invitro* DRP Modeline Geçirgenlik Testleri İle Belirlenmesi

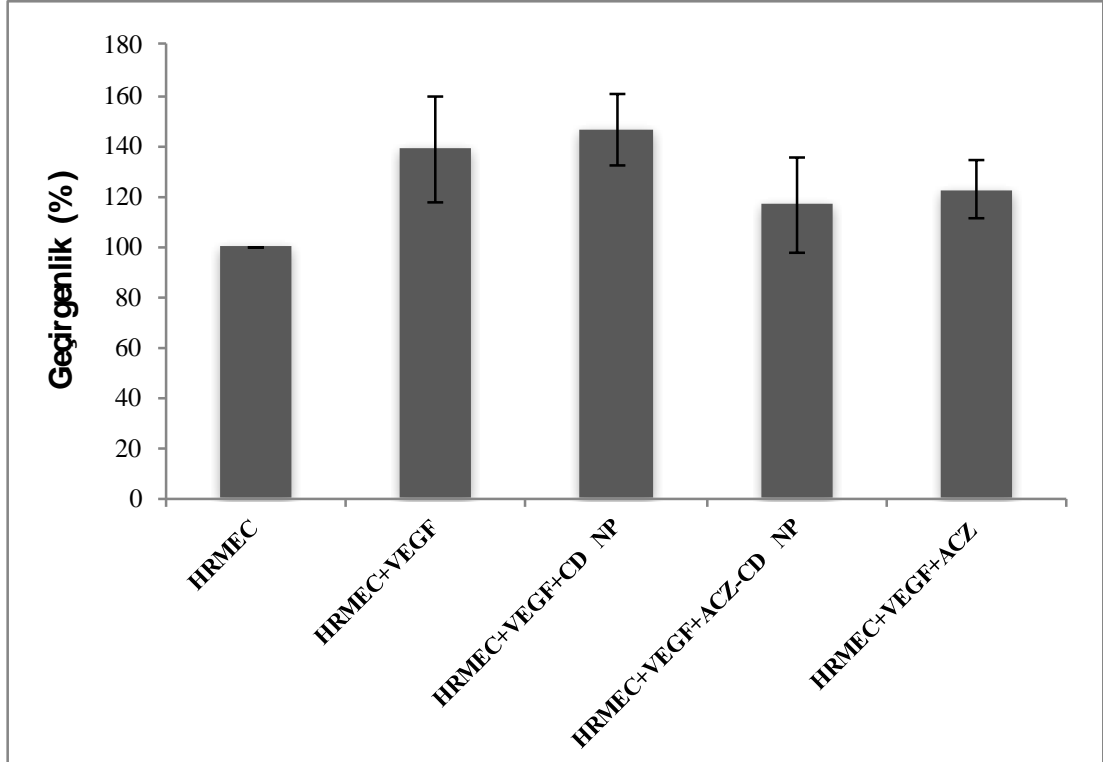
DRP hastalık modeli oluşturulan HRMEC’de, etkin madde içermeyen boş CD NP, serbest ACZ ve ACZ-CD-NP uygulamalarının tedavi edici etkisinin geçirgenlik testi sonuçlarına göre değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar Tablo 4.9. ve Şekil 4.14.’de sunulmuştur. Kontrol kuyucuğunda hücre bulunmadığı için en yüksek geçirgenlik bu kuyucukta oluşmuş ve buradan elde edilen değerlerin ortalaması %100 olarak kabul edilerek diğer insertlerdeki hücrelerin geçirgenlik yüzdeleri belirlenmiştir.

Hücreler insert yüzeyini kapladıkları için, besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin geçirgenlik yüzdeleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. VEGF endotel hücrelerinde harabiyet meydana getirdiği için VEGF ile inkübe edilen hücrelerin geçirgenliğinde artış gözlenmiştir. VEGF içeren besiyeri ile kültürü yapılan HRMEC'lerin serbest ACZ ve ACZ-CD NP'lere maruz bırakılması kontrollere kıyasla FITC işaretli dekstran geçirgenliğinin önemli ölçüde azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.14.). Boş CD nanopartiküllerin eklenmesinden sonra geçirgenlikte VEGF grubuyla yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum boş CD NP'in hücrelerin proliferasyonu ve onarımında bir etkisinin olmamasından kaynaklanmaktadır.

Tablo 4.9. Geçirgenlik testi sonuçları.

Çalışma Grubu	% Geçirgenlik	SS
HRMEC	100,09	0,09
HRMEC+VEGF	138,59	20,7
HRMEC+VEGF+CD-NP	146,79	14,18
HRMEC+VEGF+ACZ	122,76	11,1
HRMEC+VEGF+ACZ-CD-NP	116,5	18,75

HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü; CD NP: etkin madde içermeyen boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül



Şekil 4.14. Çalışma gruplarının geçirgenlik testlerinden elde edilen değerleri ($\bar{X} \pm SS$; n=3) (HRMEC: İnsan retina mikrovasküler endotel hücre hattı; VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü; CD NP: etkin madde içermeyen boş siklodekstrin nanopartikül; ACZ: Asetazolamid; ACZ-CD-NP: Asetazolamid yüklü siklodekstrin nanopartikül).

4.4. Geliştirilen ACZ yüklü Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin *in vivo* Etkinliğinin ve Toksikitesinin İncelenmesi

Tez çalışmalarının *in vivo* kısmında hedef, önceki aşamalarda geliştirilmesi, karakterizasyonu ve *in vitro* toksisite ve etkinlik çalışmaları tamamlanmış olan ACZ-CD-NP'lerin, DRP hastalık modeli geliştirilmiş tavşanlarda tedavi etkinliğini belirlemek ve diğer gruplarla karşılaştırmaktır. Bu amaçla, tavşanlarda Bölüm 3.5.4.'de anlatıldığı gibi DRP hastalık modeli oluşturulmuş ve Bölüm 3.5.3.'te tarif edildiği gibi oftalmolojik muayenelerle takipleri yapılmıştır.

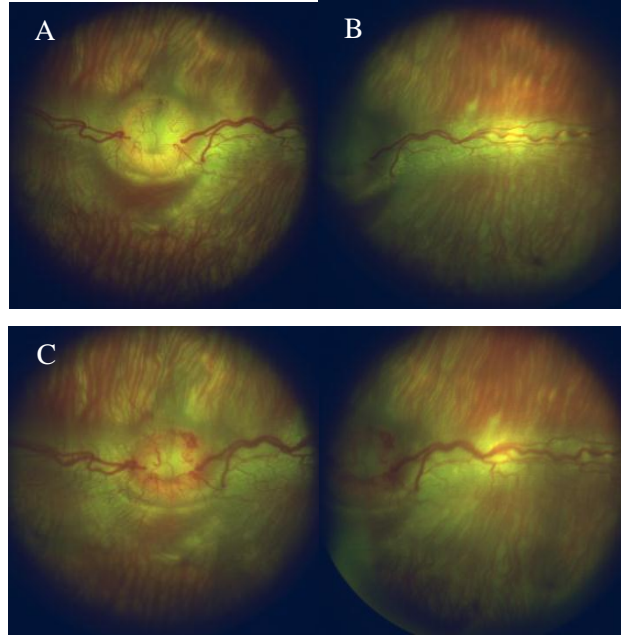
4.4.1. Deney Hayvanı

In vivo çalışmaya toplam 30 tavşan dahil edilmiştir. Bu tavşanlara yapılan uygulama ve takipler Tablo 3.4.'de anlatılan iş planına uygun olarak

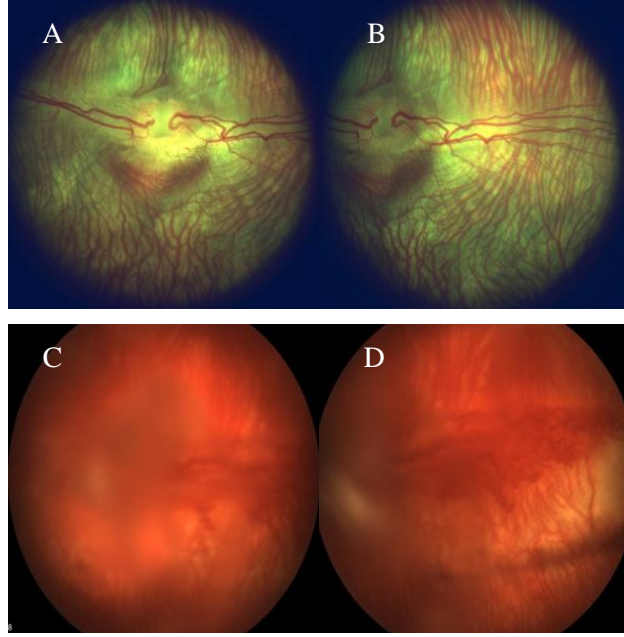
gerçekleştirilmiştir. Çalışma sürecinde yapılan 4 muayene zamanında elde edilen sonuçlar incelenerek gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Çalışmaların seyri sırasında ilaç uygulamalarına geçilmeden önceki aşamalarda kaybedilen tavşanlar çalışmadan çıkarılmıştır.

4.4.2. Tavşanlarda DRP Modelinin Oluşturulması

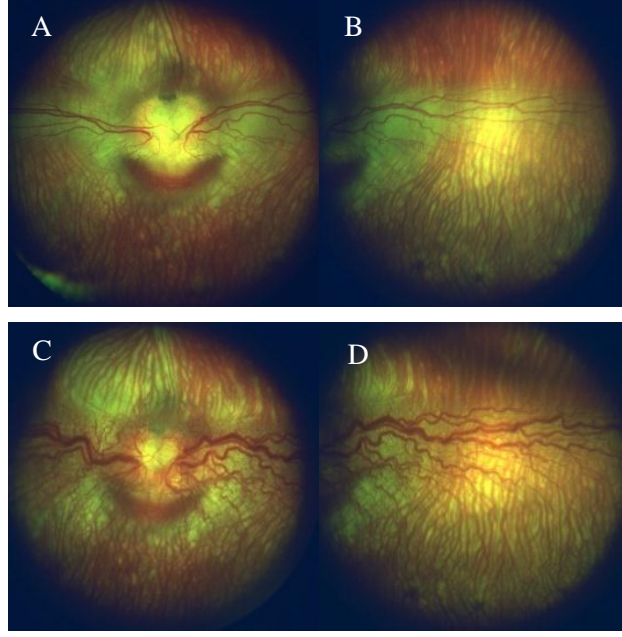
DRP hastalık modeli geliştirilmesi için tavşanlara intravitreal VEGF uygulanmıştır (290-293). Bu amaçla literatürde sıklıkla kullanılan üç farklı intravitreal VEGF konsantrasyon seçilerek DRP grubundan 3 tavşana (6,7,8 no'lu tavşanlar) uygulanmıştır (290-294). Sağ gözüne intravitreal olarak 1µg/100 µL VEGF (6 no'lu tavşan) uygulanan tavşanın 72 saat sonra yapılan fundus muayenesinde damar yapılarında bir miktar tortuozeite artışı izlenmekle birlikte DRP hastalık modeli gelişmediği izlenmiştir (Şekil 4.15.). Sağ gözüne 10µg/100 µL VEGF (7 no'lu tavşan) uygulanan tavşanın 72 saat sonra yapılan fundus muayenesinde ise DRP hastalık modelinin olduğu ancak, damar yapısındaki aşırı tortuozeite ve yoğun neovaskülarizasyona bağlı olarak vitreus hemorajisi geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.16.). Bu durum intravitreal VEGF konsantrasyonunun yüksek olduğunu gösterdiğinden, 3. tavşana (8 no'lu tavşan), 2,5 µg/100 µL VEGF intravitreal olarak uygulanmıştır. Bu tavşanın kontrol muayenesinde DRP hastalık modelinin başarı ile geliştiği görülmüştür (Şekil 4.17.). Çalışma kapsamında, intravitreal VEGF uygulamalarında bu doz tercih edilmiştir.



Şekil 4.15. 6 numaralı tavşanın, ilk muayene anında sağ gözünden alınan optik disk merkezli (A) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (B) Optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü. Tavşanın sağ gözüne $1\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ VEGF uygulamasından sonra 72. saate yapılan muayenede, optik disk merkezli (C) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (D) Optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısında dilatasyon ve tortuoza da bir miktar artış izlenmekle birlikte, DRP modeli gelişmemiştir. Optik disk üzerinde üst nasalde minimal hemoraji mevcuttur.



Şekil 4.16. 7 numaralı tavşanın ilk muayene anında optik disk merkezli (A) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (B) Optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü. Tavşanın sağ gözüne intravitreal 10 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ VEGF uygulamasından sonra 72. saate yapılan muayenede, Optik disk merkezli (C) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (D) arka segmentin izlenmesine engel olan yoğun vitreus hemorajisi izlenmektedir. Bulanık olarak seçilebilen alanlarda, medüller kanatlardan köken alan neovasküler membran gelişimi ve ciddi dilatasyon ve tortuosite artışı izlenmektedir.



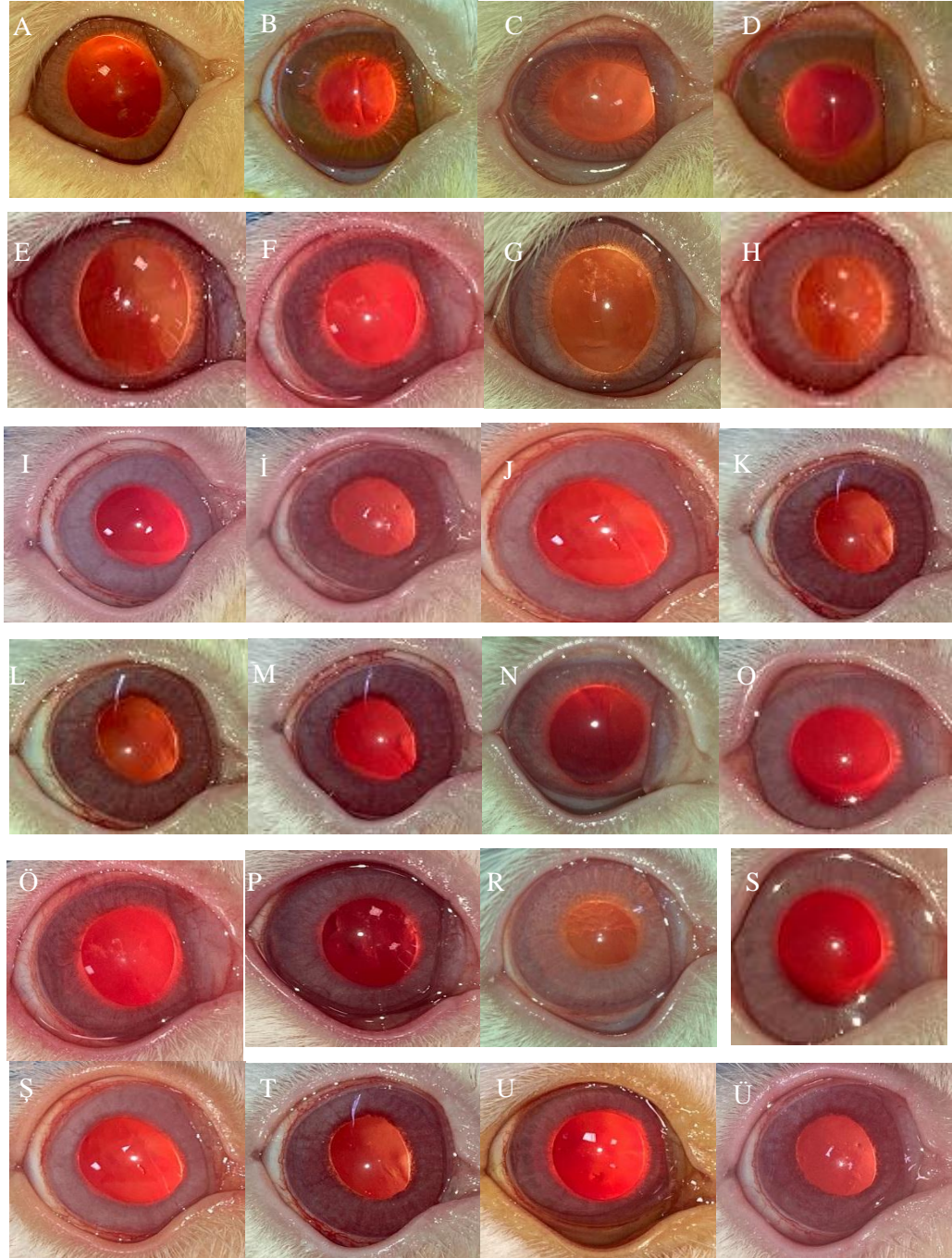
Şekil 4.17. 8 numaralı tavşanın optik disk merkezli (A) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (B) optik disk ve medüller kanatlardaki retina damar yapısının normal görünümü. Tavşanın sağ gözüne intravitreal 2,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ VEGF uygulamasından sonra 72. saate yapılan muayenede, optik disk merkezli (C) ve nasal yarıdan alınmış fundus görüntülerinde (D) arka segment net olarak izlenmekte olup vitreus hemorajisi mevcut değildir. Optik diskten ve medüller kanatlardan köken alan yoğun neovaskülarizasyon mevcuttur. Damarlarda kıvrım artışı, tortuoziye, dilatasyon ve dolgunluk artışı mevcuttur. DRP hastalık modelinin başarılı bir şekilde geliştiği izlenmektedir.

4.4.3. Oftalmoskopik Muayene ve Tetkikler

In vivo etkinliğin değerlendirilmesinde fundus muayene bulguları ve RFF, FFA, OKT, FFFM incelemelerinden elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Toksikite incelemelerinde göz içi basıncı ölçümleri, ön segment ve fundus muayene sonuçları değerlendirilmiştir.

• Ön Segment Muayenesi ve Görüntülenmesi

Ön segment muayenesinde hiçbir tavşanda, korneal ödem, endoftalmi, ön kamerada fibrin materyali, hipopiyon, pupiller düzensizlik veya sineşi izlenmemiştir (Şekil 4.18.). Tüm tavşanlarda, takip süresince yapılan tüm muayenelerde kornea berrak ön kamara saydam, pupil düzenli olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. Her gruptan temsili bir tavşanın çalışma süresince alınan ön segment fotoğrafları. Fotoğraflarda kornea berrak, ön kamara doğal, fibrin materyali, pupil düzensizliği, hipopiyon veya sineşi mevcut olmadığı izlenmektedir. Grup 1;1.,2.,3. ve 4. ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar (sırasıyla A, B, C, D), Grup 2; 1.,2.,3. ve 4. ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar sırasıyla (E, F, G, H) Grup 3;1.,2.,3. ve 4. ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar (sırasıyla I, İ, J, K), Grup 4; 1., 2., 3. ve 4. ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar (sırasıyla L, M, N, O), Grup 5; 1., 2., 3. ve 4. Ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar (sırasıyla Ö, P, R, S), Grup 6; 1., 2., 3. ve 4. ölçüm zamanlarında alınan fotoğraflar (sırasıyla Ş, T, U, Ü).

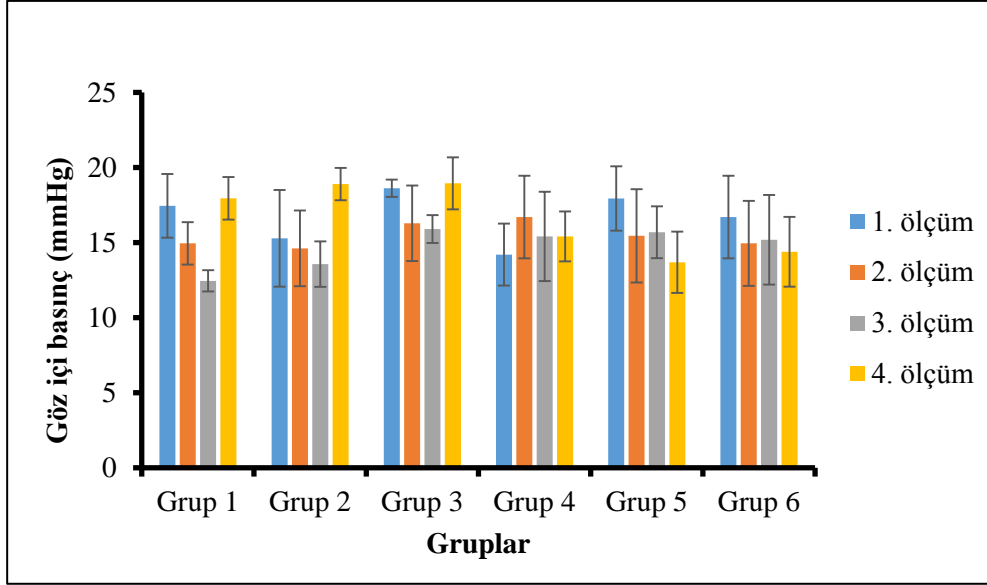
• Göz İçi Basıncı Ölçümü

Grupların hiçbirinde, takip sürecinde GIB ölçümlerinde anlamlı düzeyde değişiklik izlenmemiştir ($p>0,05$). ACZ-CD-NP grubunda (Grup 5), tedavi sonrası 1. hafta kontrolünde, GIB ölçümü 15,45 mmHg (13,90-17,95mmHg), 1. ay kontrolünde 13,45 mmHg (11,90-15,95mmHg) olarak ölçülmüştür ($p=0,69$) (Tablo 4.10. ve Şekil 4.19.).

Tablo 4.10. Göz içi Basıncı (mmHg) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Grup		ö1	ö2	ö3	ö4	Grup içi zaman karşılaştırmaları için p değerleri
1	Ortanca	17,45	14,95	12,45	17,95	0,180
	Minimum	15,95	13,95	11,95	16,95	
	Maksimum	18,95	15,95	12,95	18,95	
2	Ortanca	13,95	14,95	13,80	18,95	0,284
	Minimum	12,95	11,95	11,95	17,80	
	Maksimum	18,95	16,95	14,95	19,95	
3	Ortanca	18,95	15,95	15,95	19,95	0,122
	Minimum	17,95	13,95	14,95	16,95	
	Maksimum	18,95	18,95	16,80	19,95	
4	Ortanca	14,45	16,45	14,88	14,95	0,187
	Minimum	11,95	13,95	12,95	13,95	
	Maksimum	15,95	19,95	18,95	17,80	
5	Ortanca	18,45	15,45	15,45	13,45	0,069
	Minimum	14,95	11,95	13,90	11,95	
	Maksimum	19,90	18,95	17,95	15,90	
6	Ortanca	16,45	13,95	14,93	13,45	0,306
	Minimum	13,95	12,95	11,95	12,85	
	Maksimum	19,95	18,95	18,95	17,80	

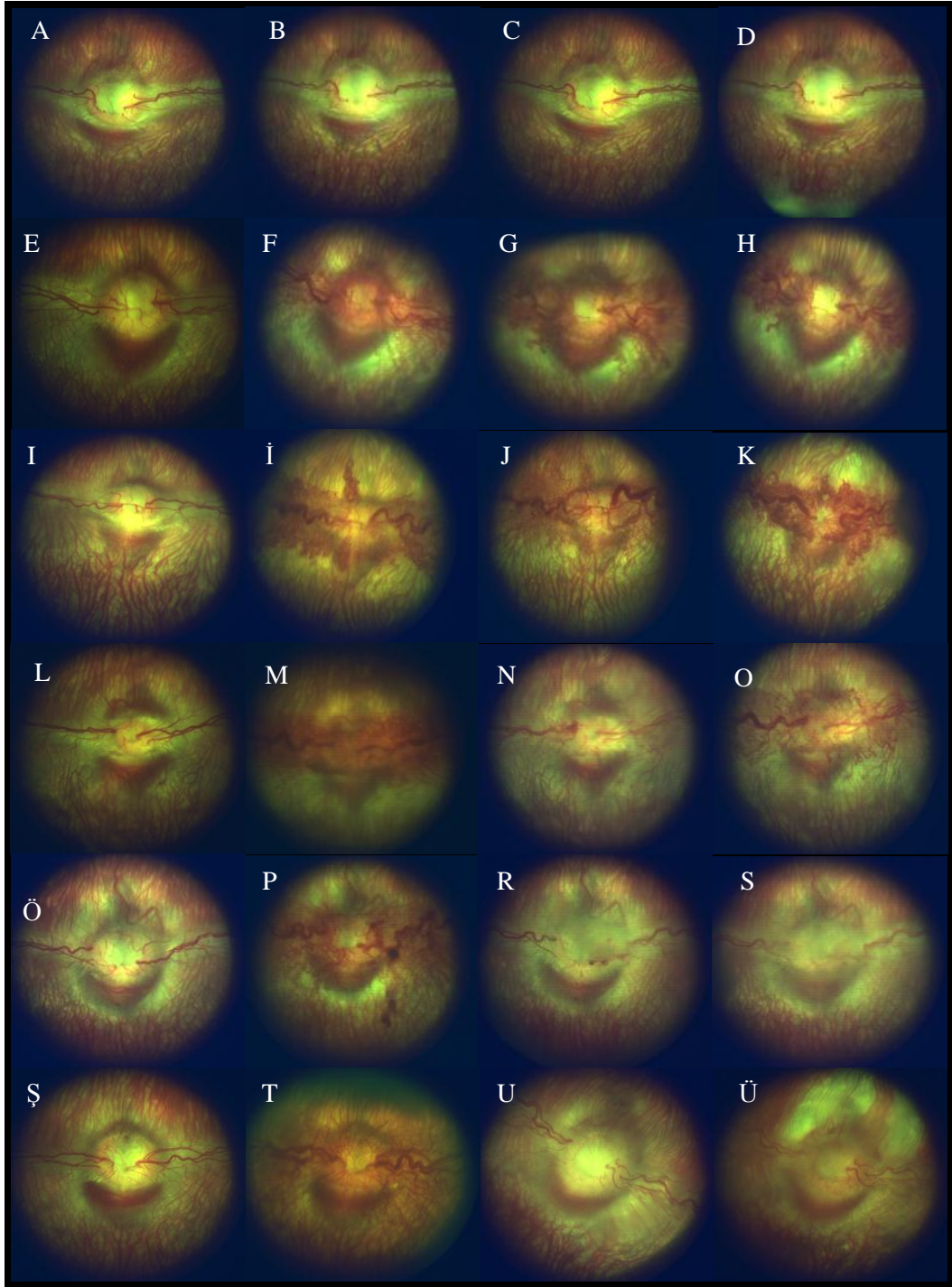
ö1: 1.ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. Ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3.Ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4.ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)



Şekil 4.19. Çalışma gruplarında yer alan tavşanların, çalışma süresince yapılan takip muayenelerinde gruplardan elde edilen GIB ölçümlerinin (mmHg) ortalanca değerlerinin zamana bağlı değişimi.

- **Fundus Muayenesi ve Renkli Fundus Fotoğrafları**

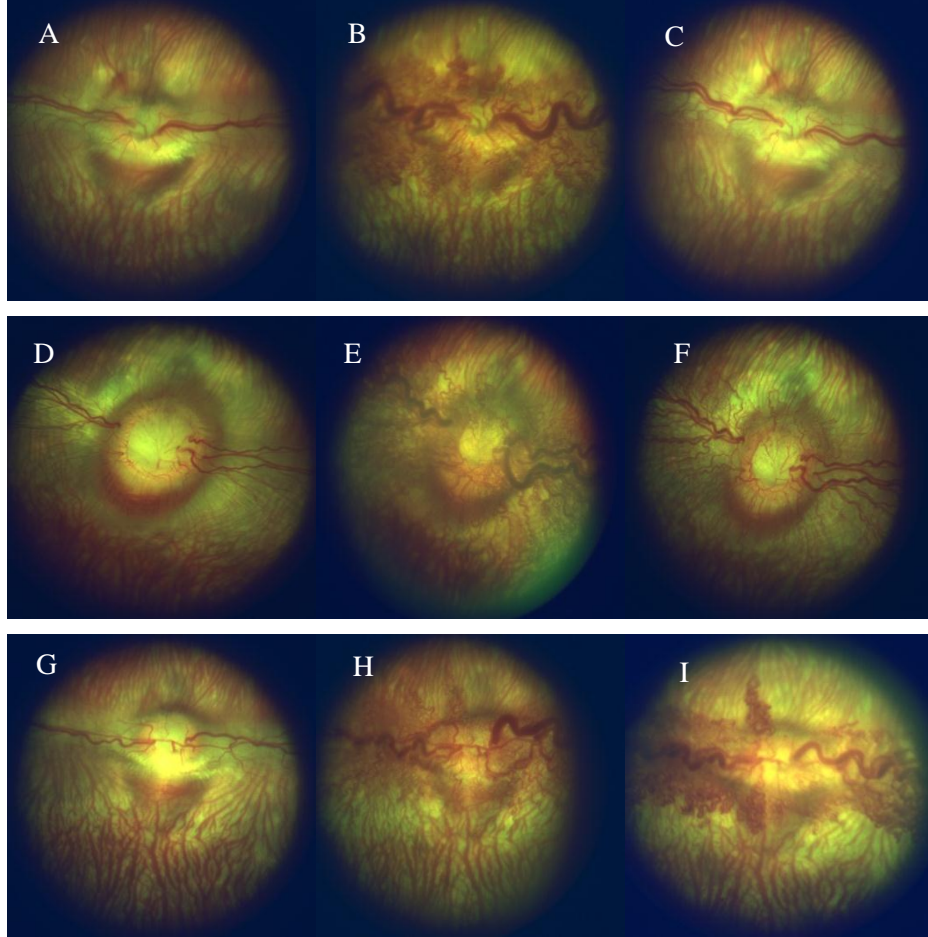
Fundus muayenelerinde vitreus, optik sinir, retinal vasküler yapılar ve area santralis değerlendirilmiştir. Tüm tavşanlarda vitreus berrak, fundus rahatlıkla izlenebilir olarak gözlemlenmiştir. Tavşanların tamamında, optik sinir, area santralis ve retinal damar yapıları net olarak değerlendirilebilmiştir. Hiçbir tavşanda vitreusta bulanıklık veya retinada harabiyet gözlemlenmemiş, inflamasyon veya enfeksiyona ait bir arka segment bulgusu izlenmemiştir (Şekil 4.20.).



Şekil 4.20. Çalışma gruplarında yer alan tavşanların, çalışma süresince yapılan takip muayenelerinde elde edilen bulgular. Her bir gruptan bir temsili tavşanın çalışmaya dahil edilmiş olan sağ gözünden, takip sürecinde kaydedilmiş fundus görüntüleri verilmiştir. A-D) Grup 1: Çalışmanın ilk günü, tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (A) Çalışma sürecinde yapılan tüm takip muayenelerinde, normal fundus görünümü izleniyor (A,B,C,D) E-H) Grup 2: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (E), DRP hastalık

modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoosite artışı izleniyor (F) DRP'ye bağlı optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyonun, vasküler dilatasyonun ve tortuoosite artışının aynı şiddette devam ettiği izleniyor (G,H) I-K) Grup 3: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (I), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoosite artışı izleniyor (İ) İntravitreal PBS uygulamasından sonraki 1. hafta ve 1. ayda yapılan muayenelerde, DRP'ye bağlı optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyonun, vasküler dilatasyonun ve tortuoosite artışının aynı şiddette devam ettiği izleniyor (J-K) L-O) D.Grup 4: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (L), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoosite artışı izleniyor (M) İntravitreal serbest ACZ uygulamasından 1 hafta sonra yapılan muayenede, tedavi sonrasında neovaskülarizasyonunda azalma olmakla birlikte hala optik disk ve meduller kanatlardan kaynaklanan bir miktar neovaskülarizasyonun varlığı izleniyor, vasküler dilatasyon ve tortuoosite kısmi azalma olsa da hastalık öncesi evreye oranla hala anlamlı oranda DRP bulguları mevcut (N), İntravitreal serbest ACZ uygulamasından 1 ay sonra yapılan muayenede, DRP'ye bağlı optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyonun, vasküler dilatasyonun ve tortuoositenin artmış olduğu izleniyor (O), Ö-S) Grup 5 : Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (Ö), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoosite artışı izleniyor (P) İntravitreal ACZ-CD NP uygulaması sonrasında 1. haftada ve 1. ayda yapılan muayenelerde, DRP'ye ait bulgularının tamamen iyileştiği izleniyor. Optik disk ve retinal damarlardan kaynaklanan neovaskülarizasyonun tamamen gerilediği, vasküler dilatasyon ve tortuoositenin hastalık öncesi evreye geri döndüğütepeit ediliyor (R,S),Ş-Ü) Grup 6: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (Ş), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoosite artışı izleniyor (T) İntravitreal bevasizumab uygulamasından sonraki 1. haftada ve 1. ayda yapılan muayenelerde, neovaskülarizasyonun tamamen gerilediği, vasküler dilatasyon ve tortuoositenin iyileşerek damar yapısının ve boyutlarının hastalık öncesi evreye geri döndüğü izleniyor. (U, Ü).

Fundus muayenesine DRP'nin derecesi, yeni damar oluşumunun gerileme paternine göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.21.) (145). Çalışma süresince grupların 4 ölçümde elde edilen muayene bulguları, bu dereceleme sistemine göre derecelendirilerek istatistiksel olarak incelenmiştir (Tablo 4.11. - 4.13. ve Şekil 4.22.)



Şekil 4.21. Yeni Damar Oluşumunun takibinde kullanılan derecelendirme sistemi: A-C) Derece 1: Yeni damar oluşumunun tam gerilemesi: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli medüller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (A), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoziye artışı izleniyor (B), tedavi sonrasında neovaskülarizasyonun tamamen gerilediği, vasküler dilatasyon ve tortuoziyenin iyileşerek damar yapısının ve boyutlarının hastalık öncesi evreye geri döndüğü izleniyor (C). D-F) Derece 2. Yeni damar oluşumunun kısmi gerilemesi: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli medüller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (D), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskülarizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuoziye artışı

izleniyor (E) tedavi sonrasında neovaskularizasyonunda azalma olmakla birlikte hala optik disk ve meduller kanatlardan kaynaklanan bir miktar neovaskularizasyonun varlığı izleniyor, vasküler dilatasyon ve tortuozitede kısmi azalma olsa da hastalık öncesi evreye oranla hala anlamlı oranda DRP bulguları mevcut (F) (G-I) Derece 3. Yeni damar oluşumunda gerileme izlenmemesi: Tavşanın sağ gözünden alınan optik disk merkezli meduller kanatların izlendiği normal fundus görünümü izleniyor (G), DRP hastalık modelinin oluşturulmasından sonra yapılan muayenede, optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskularizasyon, vasküler dilatasyon ve tortuosite artışı izleniyor (H) DRP'ye bağlı optik diskten ve medüller kanatlardaki retinal damarlardan kaynaklanan yoğun neovaskularizasyonun, vasküler dilatasyonun ve tortuozite artışının aynı şiddette devam ettiği izleniyor (I).

DRP hastalık bulgularına ait verilerin istatistiksel olarak incelenmesi sonrasında, Tablo 4.11.'de grup için hesaplanan ANOVA tipi istatistik (ATİ); 127,05, zaman için hesaplanan ATİ; 226,51 ve grup*zaman etkileşimi için hesaplanan ATİ; 32,20 olarak elde edilmiş ve bu istatistiklere göre elde edilen tüm p değerleri <0,001 olarak bulunmuştur. Ortalama grup etkisinin anlamlı olması, gruplar arasında DRP değerleri bakımından farklılık olduğunu göstermektedir. Tablo 4.12.'de, 1.grupta DRP için görelî deneme etkisi 0,26 bulunmuştur. Sıra sayı ortalaması en düşük olan grup 1.gruptur. Buna göre, 1.grupta DRP skorlarının diğer gruplardan elde edilen ortalama deneme etkilerinden daha düşük olduğu söylenebilir. 2. ve 3.grupta ise deneme etkileri en büyüktür ve en yüksektir.

Basit zaman etkisinin incelendiğinde, 1.2.3. ve 4. zaman noktalarına ait görelî deneme etkileri sırasıyla; 0,26; 0,69; 0,50; 0,52 olarak hesaplanmıştır. Görelî etkiler yorumlanırken, dört zaman noktasının mevcut etkiyi nasıl paylaştıkları üzerinde durulur. Zamana ait görelî deneme etkileri incelenirken grup faktörü göz ardı edilerek inceleme yapılmaktadır. Daha genel bir ifadeyle, zaman noktaları için görelî deneme etkilerinin eğilimi değerlendirildiğinde, 2.zamanda etkinin en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. Grup*zaman etkileşiminin anlamlı bulunması, zaman noktaları arası değişimin gruplarda benzer olmadığı anlamına gelir. Grupların farklı zaman noktalarındaki marjinal görelî etkileri, bu etkilere ait %95 güven aralıkları ve tahmini yan (bias) değerleri Tablo 4.13.'te sunulmuştur. Çalışmada elde edilen tüm tahmini yan değeri sıfır olup sonuçların güvenilir olduğu söylenebilir. Etkileşimin incelenmesi adına ele alınan marjinal görelî etkiler için de durum görelî deneme etkilerinden

farksızdır. Bu sefer her bir gruba ait her bir zaman noktasının bir marjinal görelî etkisi hesaplanmış ve yorumlanırken bu değerler kullanılmıştır. Bu çalışmada yer alan örnek için 6 grup ve 4 zaman noktası olduğuna göre, toplam 24 marjinal görelî etkinin ortalamasının 0,50 olması beklenir. Bu bilgiler ışığında, 1 grubun marjinal görelî etki değeri zamana bağılı değişmezken 2. ve 3. grupta 2.zaman sonrası artmış, 4.,5. ve 6. gruplarda 2.zamanda en yüksek değeri almıştır. Verilen tüm sonuçların ortanca (min-maks) istatistikleri ile de benzer olduğu açıktır. Her bir grup içinde zamanların ikili karşılaştırmaları ve her bir zamanda grup karşılaştırmaları da Tablo 4.13.'de sunulmuştur.

Tablo 4.11. DRP için F1 LD F1 tasarımı.

Faktör	F_n	sd	p
Grup	127,05	1,54	<0,001
Zaman	226,51	1,00	<0,001
Grup*Zaman	32,20	1,54	<0,001

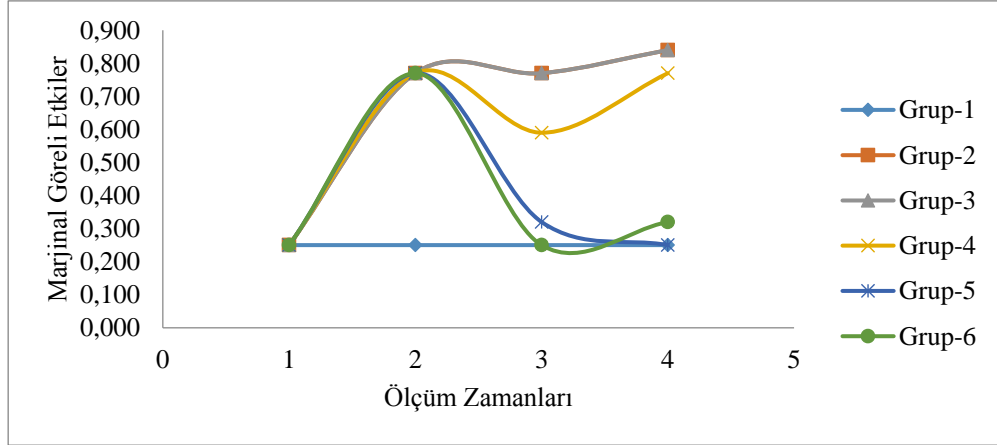
Tablo 4.12. DRP verisinden elde edilen görelî etkiler.

Grup	Sıra Sayıları Ortalamaları	Gözlem sayısı	Görelî etki
1	21,50	8	0,26
2	52,25	12	0,65
3	52,25	12	0,65
4	48,50	16	0,60
5	33,13	16	0,41
6	31,75	16	0,39
Zaman			
1	21,50	20	0,26
2	55,67	20	0,69
3	40,42	20	0,50
4	42,00	20	0,52

Tablo 4.13. DRP değerleri için farklı grup ve zaman noktalarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları

Grup		Zaman noktaları				Grup içi zaman karşılaştırmaları için p değerleri
		ö1	ö2	ö3	ö4	
1	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,26	0,26	0,26	1,0
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,25	0,25	0,25	
	Üst sınır	0,28	0,28	0,28	0,28	
2		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,78	0,78	0,78	0,058
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,76	0,76	0,76	
Üst sınır	0,28	0,79	0,79	0,79		
3		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,78	0,78	0,78	0,058
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-3)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,76	0,76	0,76	
Üst sınır	0,28	0,79	0,79	0,79		
4		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,78	0,59	0,78	(ö1) vs (ö2) 0,020 (ö1) vs (ö4) 0,020
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	2,5 (1-3)	3 (3-3)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,76	0,36	0,76	
Üst sınır	0,28	0,79	0,78	0,79		
5		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,78	0,33	0,26	(ö1) vs (ö2) 0,020 (ö2) vs (ö4) 0,020
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	1 (1-2)	1 (1-1)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,76	0,22	0,25	
Üst sınır	0,28	0,79	0,46	0,28		
6		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,26	0,78	0,26	0,26	(ö1) vs (ö2) 0,028 (ö2) vs (ö3) 0,028 (ö2) vs (ö4) 0,028
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	1 (1-1)	1 (1-1)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,25	0,76	0,25	0,25	
Üst sınır	0,28	0,79	0,28	0,28		
	Zaman içi grup karşılaştırmaları için p değerleri	1,0	1vs2 0,023 1vs3 0,023 1vs4 0,023 1vs5 0,023 1vs6 0,023	1vs2 0,023 1vs3 0,023 4vs6 0,023 2vs6 0,007 3vs6 0,007 2vs5 0,011 3vs5 0,011	1vs2 0,023 1vs3 0,023 1vs4 0,013 2vs5 0,007 3vs5 0,007 4vs5 0,011 2vs6 0,007 3vs6 0,007 4vs6 0,004	

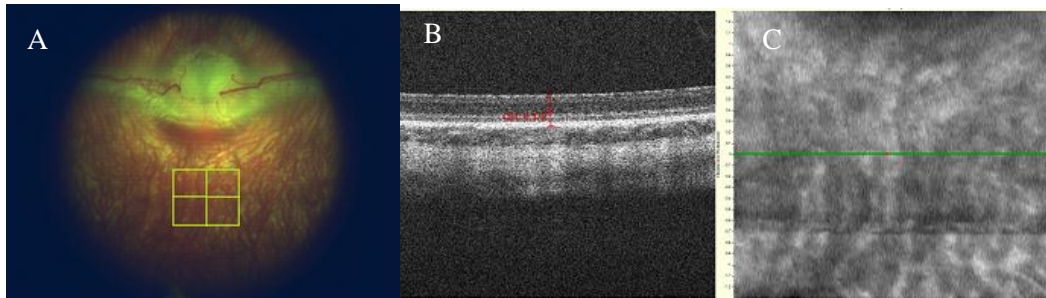
ö1:1. ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2:2. ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3:3. ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4:4. ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi.)



Şekil 4.22. Grupların DRP bulgularının çalışma boyunca değişimi.

• Optik Koherens Tomografi

Tavşanların OKT çekimleri sağ gözünün area santralis bölgesinden alınmıştır. Retina tabakaları insan OKT görüntüleri ve tavşan OKT görüntülerinin değerlendirme kriterlerine göre değerlendirilmiştir (294-297,303). Retina kalınlıkları, horizontal kesitlerde santraldeki aynı noktadan ölçülmüştür. İç limitan membran-Bruch Membranı (ILM- BM) arasındaki alan retina kalınlığı olarak kabul edilmiştir Area santralindeki retina kalınlığı, cihazın kendi yazılımındaki kaliper yardımıyla ölçülmüştür (Bioptigen InVivoVue, version 2.4.34) (Şekil 4.23) (277).



Şekil 4.23. Tavşan gözünde alınan OCT kesitinin retinada tekabül ettiği alanın gösterimi (A). Tavşan fundus fotoğrafında area santralis (A)Area santralisten alınan OKT kesitinde OKT kalınlık ölçümü (B). Area santralisten alınan OKT kalınlık ölçümü yapılan noktanın optik disk sınırına uzaklığı (C).

Gruplar arasında ilk ölçümlerde yapılan OKT değerleri açısından fark olmadığı izlenmiştir ($p=0,408$) (1. ölçüm). Çalışmaya dahil edilen tavşanların area santralindeki retina kalınlık ölçümleri $169,87\pm 949\mu$ olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında 2. ölçümde elde edilen OKT değerleri açısından ($p=0,011$), 3 ölçümde elde edilen OKT

değerleri açısından ($p<0,001$) ve 4. ölçümde elde edilen OKT değerleri açısından anlamlı fark olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 4.14. ve Şekil 4.24.).

OKT ölçümlerinde elde edilen veriler incelendiğinde DRP modeli oluşturulduktan sonra yapılan muayenelerde (2. ölçüm), Grup 2, Grup 3, Grup 5 ve Grup 6'da DRP hastalık modeli oluşumunun area santraliste retina kalınlığında anlamlı ölçüde artmaya sebep olduğu gözlemlenmektedir (Tablo 4.14. ve Şekil 4.24.). Grup 4'te de retina kalınlığında benzer artış izlenmekle birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

Uygulanan tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla DRP'ye bağlı olarak gelişen bu retina kalınlık artışının tedavi sonrası değişimi incelenmesi amacıyla OKT ile ölçülen retina kalınlıklarının grup içi ve gruplar arası karşılaştırmaları yapılmıştır. Her bir gruba uygulanan tedavinin retina kalınlığı üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla grup içi karşılaştırmalar yapılmıştır.

Her bir grubun tedavi sonrası 1. hafta (3. ölçüm) ve 1. ayda (4. ölçüm) yapılan muayenelerde elde edilen retina kalınlıkları, aynı grubun çalışmanın başında (1. ölçüm) ve DRP hastalık modeli oluşturulduktan sonra (2. ölçüm) yapılan muayenelerde elde edilen ölçümleriyle karşılaştırılmıştır. Grup 1'in 3. ölçüm zamanında ve 4. ölçüm zamanında elde edilen OKT kalınlıkları ile 2. ölçüm zamanında elde edilen retina kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmemiştir. Grup 2 ve Grup 3 için de 3. ölçüm zamanında ve 4. ölçüm zamanında ölçülen retina kalınlıkları ile 2. Ölçüm zamanında ölçülen retina kalınlıkları arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir. Grup 4'te 3. ölçüm zamanı ile 2. ölçüm zamanı arasında anlamlı fark izlenirken ($p<0,001$), 4. ölçüm zamanı ile 2. ölçüm zamanı arasında anlamlı fark izlenmemiştir ($p=0,295$). Grup 5'in hem 3. ölçüm zamanında hem de 4. ölçüm zamanında ölçülen retina kalınlıkları, 2. Ölçüm zamanında ölçülen retina kalınlıklarından anlamlı olarak farklıdır ($p<0,001$, $p<0,001$). Grup 6'nın, 3. ölçüm zamanında ve 4. ölçüm zamanında elde edilen retina kalınlıkları ile 2. ölçüm zamanında elde edilen kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,001$, $p<0,001$) (Bkz. Tablo 4.15.).

Tablo 4.14. Çalışma gruplarında yer alan tavşanların çalışma süresince 1., 2., 3. ve 4. Ölçüm zamanlarında OKT ile ölçülen retina kalınlıklarının (μ), ortalama standart sapma, standart hata ve medyan değerleri.

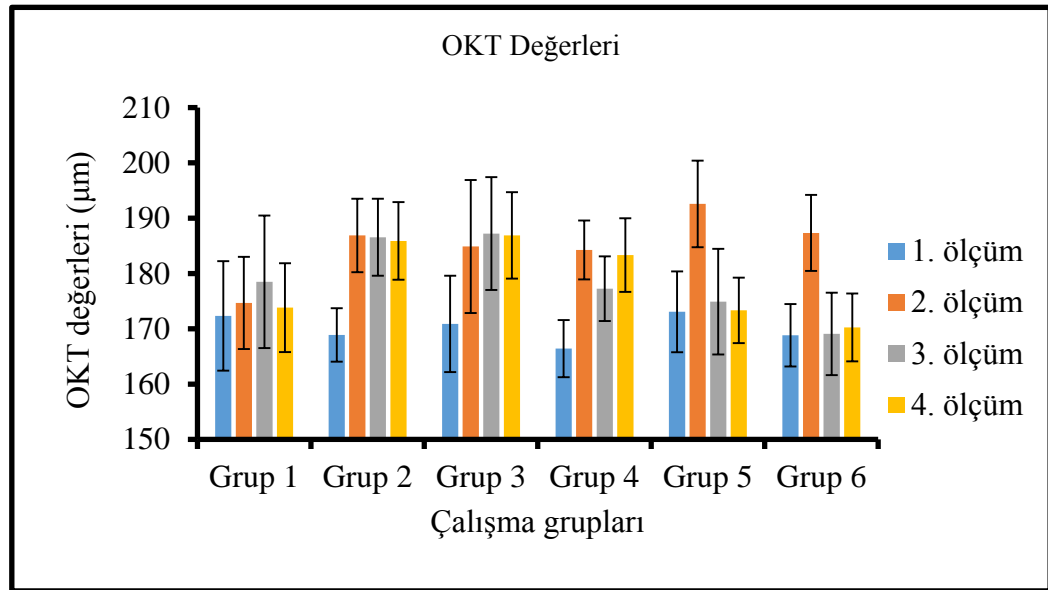
	grup	ölçüm1	ölçüm2	ölçüm3	ölçüm4
1	Ortalama	172,33	174,67	178,50	173,83
	Tavşan sayısı	6	6	6	6
	Standart Sapma	9,893	8,335	11,979	8,035
	Ortanca	173,00	173,50	179,00	174,00
	Standart Hata	4,039	3,403	4,890	3,280
2	Ortalama	168,89	186,89	186,56	185,89
	Tavşan sayısı	9	9	9	9
	Standart Sapma	4,833	6,642	6,966	7,008
	Ortanca	169,00	186,00	187,00	185,00
	Standart Hata	1,611	2,214	2,322	2,336
3	Ortalama	170,89	184,89	187,22	186,89
	Tavşan sayısı	9	9	9	9
	Standart Sapma	8,710	12,025	10,208	7,817
	Ortanca	168,00	189,00	186,00	185,00
	Standart Hata	2,903	4,008	3,403	2,606
4	Ortalama	166,42	184,25	177,25	183,33
	Tavşan sayısı	12	12	12	12
	Standart Sapma	5,160	5,328	5,848	6,665
	Ortanca	165,50	182,50	177,00	185,00
	Standart Hata	1,490	1,538	1,688	1,924
5	Ortalama	173,08	192,58	174,92	173,33
	Tavşan sayısı	12	12	12	12
	Standart Sapma	7,305	7,833	9,549	5,914
	Ortanca	173,50	191,00	174,50	172,50
	Standart Hata	2,109	2,261	2,756	1,707
6	Ortalama	168,83	187,33	169,08	170,25
	Tavşan sayısı	12	12	12	12
	Standart Sapma	5,654	6,867	7,452	6,122
	Ortanca	169,00	186,00	168,50	170,50
	Standart Hata	1,632	1,982	2,151	1,767
Total	Ortalama	169,87	186,07	178,17	178,68
	Tavşan sayısı	60	60	60	60
	Standart Sapma	6,949	8,953	10,438	9,353
	Ortanca	169,00	186,00	177,50	179,00
	Standart Hata	1,897	1,156	1,348	1,207

ö1: 1.ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3.ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4.ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)

Tablo 4.15. Grupların, 3. ve 4. ölçüm zamanlarındaki retina kalınlık ölçümlerinin, 2. ölçüm zamanındaki retina kalınlık ölçümleri ile karşılaştırmaları için p değerleri.

Grup-1	ö3	ö4
ö2	0,125	0,375
Grup-2	ö3	ö4
ö2	0,406	0,180
Grup-3	ö3	ö4
ö2	0,135	0,281
Grup-4	ö3	ö4
ö2	0,00	0,295
Grup-5	ö3	ö4
ö2	0,00	0,00
Grup-6	ö3	ö4
ö2	0,00	0,00

ö1: 1. ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3. ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4. ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)

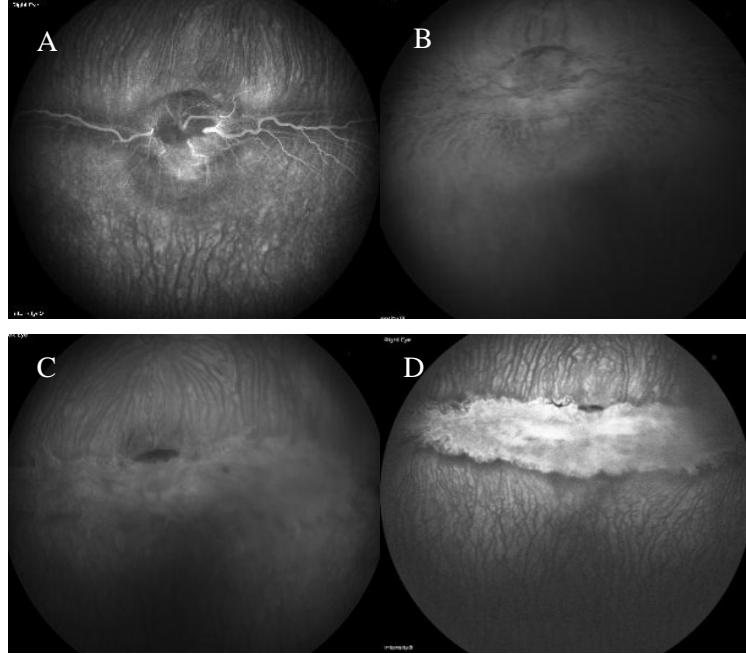


Şekil 4.24. Çalışma gruplarında yeralan tavşanların çalışma süresince 1., 2., 3. ve 4. ölçüm zamanlarında OKT ile ölçülen retina kalınlıkları (μ) ($\bar{X} \pm SS$, n=3).

• Fundus Fluoresein Anjiografi

Retinal vasküler geçirgenliğin artışı DRP patogenezindeki en temel mekanizmadır. İn vivo ortamda KRB harabiyetinin en önemli göstergelerinden birisi FFA incelemesidir. FFA incelemelerinde, KRB harabiyetinin olduğu alanlarda fluoreseinin damar dışına sızdığı izlenir. Tez çalışmaları kapsamında tavşanlarda

yapılan FFA çekimlerinden alınan görüntüler, retina damarlarında izlenen fluoresein sızıntısının miktarına göre derecelendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılarak gruplar arasındaki farklar incelenmiştir (27, 297, 298) (Tablo 4.16-4.18. ve Şekil 4.25.; 4.26.)



Şekil 4.25. FFA görüntülerinde, optik diskten ve meduller kanatlardaki retinal damarlardan olan fluoresein sızıntısının düzeyinin değerlendirilmesi. A) Derece 1: Normal retina damarlarında, intravasküler fluoreseinin görünümü B) Derece 2: Hafif düzeyde fluoresein sızıntısı:Optik disk ve retinal damarlardan, hafif düzeyde fluoresein sızıntısı mevcut, optik disk ve retinal damarlar izlenebiliyor C) Derece 3: Belirgin düzeyde fluoresein sızıntısı mevcut, optik disk ve retinal damarlar bazı alanlarda fluoresein tarafından bloke edilse de kısmen izlenebiliyor D) Derece 4: Ciddi düzeyde fluoresein sızıntısı mevcut, optik disk ve retina damarlarının yapısı, yoğun fluoresein sızıntısı sebebiyle seçilemiyor.

Tablo 4.16. FFA için F1 LD F1 tasarımı.

Faktör	F_n	sd	p
Grup	113,11	4,24	<0,001
Zaman	194,87	1,68	<0,001
Grup*Zaman	27,79	4,55	<0,001

Tablo 4.17. FFA verisinden elde edilen görelî etkiler.

Grup	Sıra Sayıları Ortalamaları	Gözlem sayısı	Görelî etki
1	20,50	8	0,25
2	53,08	12	0,66
3	53,08	12	0,66
4	48,06	16	0,59
5	32,28	16	0,40
6	32,28	16	0,40
Zaman			
1	20,50	20	0,25
2	55,08	20	0,68
3	39,81	20	0,49
4	44,13	20	0,55

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonrasında, Tablo 4.16.'da gruplar için hesaplanan ANOVA tipi istatistik (ATİ); 113,11, zaman için hesaplanan ATİ; 194,87 ve grup*zaman etkileşimi için hesaplanan ATİ; 27,79 olarak elde edilmiş ve bu sonuçlara göre elde edilen tüm p değerleri <0,001 olarak bulunmuştur. Ortalama grup etkisinin anlamlı olması, gruplar arasında DRP değerleri bakımından farklılık olduğunu göstermektedir. Tablo 4.17'de, 1.grupta DRP için görelî deneme etkisi 0,25 bulunmuştur. Sıra sayı ortalaması da en düşük grup 1.gruptur. Buna göre, 1.grupta DRP skorlarının diğer gruplardan elde edilen ortalama deneme etkilerinden daha düşük olduğu söylenebilir. 2. ve 3.grupta ise deneme etkileri en büyüktür ve en yüksektir.

Basit zaman etkisi incelendiğinde, 1.2.3. ve 4. zaman noktalarına ait görelî deneme etkileri sırasıyla; 0,25; 0,68; 0,49; 0,55 olarak hesaplanmıştır. Görelî etkiler yorumlanırken, dört zaman noktasının mevcut etkiyi nasıl paylaştıkları üzerinde durulur. Zamana ait görelî deneme etkileri incelenirken grup faktörü göz ardı edilerek inceleme yapılmaktadır. Daha genel bir ifadeyle, zaman noktaları için görelî deneme etkilerinin eğilimi değerlendirildiğinde, 2. zamanda etkinin en yüksek değere ulaştığı görülmektedir. Grup*zaman etkileşiminin anlamlı bulunması, zaman noktaları arası değişimin gruplarda benzer olmadığı anlamına gelir. Grupların farklı zaman noktalarındaki marjinal görelî etkileri, bu etkilere ait %95 güven aralıkları ve tahmini

yan (bias) değerleri Tablo 4.18.'de sunulmuştur. Çalışmada elde edilen tüm tahmini yan değeri sıfır olup sonuçların güvenilir olduğu söylenebilir. Etkileşimin incelenmesi adına ele alınan marjinal görel etkiler için de durum görel deneme etkilerinden farksızdır. Bu sefer her bir gruba ait her bir zaman noktasının bir marjinal görel etkisi hesaplanmış ve yorumlanırken bu değerler kullanılmıştır. Bu çalışmada yer alan örnek için 6 grup ve 4 zaman noktası olduğuna göre, toplam 24 marjinal görel etkinin ortalamasının 0,50 olması beklenir. Bu bilgiler ışığında, 1. grubun marjinal görel etki değeri zamana bağlı değişmezken 2. ve 3. grupta 2. zaman sonrası artmış, 4.,5. ve 6. gruplarda 2. zamanda en yüksek değeri almıştır. Verilen tüm sonuçların ortanca (min-maks) istatistikleri ile de benzer olduğu açıktır. Her bir grup içinde zamanların ikili karşılaştırmaları ve ver bir zamanda grup karşılaştırmaları da Tablo 4.18.'de sunulmuştur.

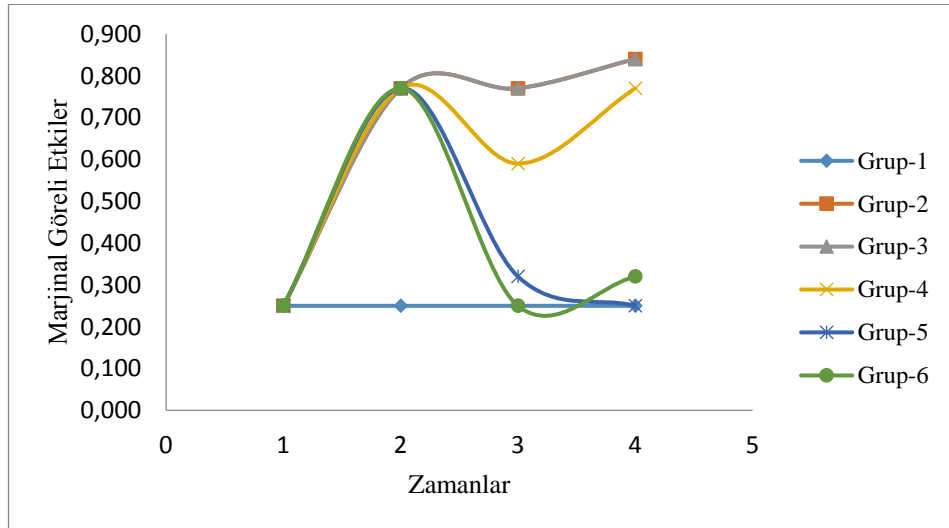
Tablo 4.18. FFA değerleri için farklı grup ve zaman noktalarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları.

Grup	Zaman noktaları				Grup içi zaman karşılaştırmaları için p değerleri	
	1	2	3	4		
1	Marjinal görel etkiler	0,25	0,25	0,25	0,25	1,0
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,23	0,23	0,23	0,23	
	Üst sınır	0,27	0,27	0,27	0,27	
2		1	2	3	4	
	Marjinal görel etkiler	0,25	0,77	0,77	0,84	(ö1) vs (ö4) 0,027
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-4)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,23	0,75	0,75	0,66	
Üst sınır	0,27	0,79	0,79	0,93		
3		1	2	3	4	
	Marjinal görel etkiler	0,25	0,77	0,77	0,84	(ö1) vs (ö4) 0,027
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	3 (3-3)	3 (3-4)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,23	0,75	0,75	0,66	
Üst sınır	0,27	0,79	0,79	0,93		
4		1	2	3	4	
	Marjinal görel etkiler	0,25	0,77	0,59	0,77	(ö1) vs (ö2) 0,009 (ö1) vs (ö4) 0,009
	Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	2 (2-3)	3 (3-3)	
	Tahmini yan (bias)	0	0	0	0	
	%95 güven aralığı					
	Alt sınır	0,23	0,75	0,48	0,75	
Üst sınır	0,27	0,79	0,69	0,79		

Tablo 4.18. Devam FFA değerleri için farklı grup ve zaman noktalarına ait istatistiksel değerlendirme sonuçları.

5		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,25	0,77	0,32	0,25	(ö1) vs (ö2) 0,020 (ö2) vs (ö4) 0,020
Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	1 (1-2)	1 (1-1)		
Tahmini yan (bias)	0	0	0	0		
%95 güven aralığı						
Alt sınır	0,23	0,75	0,21	0,23		
Üst sınır	0,27	0,79	0,46	0,27		
6		1	2	3	4	
	Marjinal görelî etkiler	0,25	0,77	0,25	0,32	(ö1) vs (ö2) 0,020 (ö2) vs (ö3) 0,020
Ortanca (min-maks)	1 (1-1)	3 (3-3)	1 (1-1)	1 (1-2)		
Tahmini yan (bias)	0	0	0	0		
%95 güven aralığı						
Alt sınır	0,23	0,75	0,23	0,21		
Üst sınır	0,27	0,79	0,27	0,46		
Zaman içi grup karşılaştırmaları için p değerleri		1.0	1vs2 0,023 0,023 1vs3 0,023 1vs4 0,013 1vs5 0,013 1vs6 0,013	1vs2 0,023 1vs3 0,023 1vs4 0,023 2vs4 0,033 2vs5 0,011 2vs6 0,007 3vs4 0,033 3vs5 0,011 3vs6 0,007 4vs5 0,020 4vs6 0,006	1vs2 0,034 1vs3 0,034 1vs4 0,013 2vs5 0,009 2vs6 0,013 3vs5 0,009 3vs6 0,013 4vs5 0,004 4vs6 0,006	

ö1: 1.ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3.ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4.ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)



Şekil 4.26. Grupların FFA derecelerinin çalışma süresince değişimi.

- **FFFM İncelemeleri**

KRB harabiyetinin *in vivo* ortamda değerlendirilebilmesine imkan veren diğer bir tetkik FFFM incelemeleridir. FFFM incelemelerinde elde edilen ölçümler, KRB harabiyetinin sayısal olarak değerlendirilebilme imkanı sağlar. KRB harabiyetinin incelenmesinde, her bir ölçüm zamanında sağ gözden elde edilen ölçüm değerleri, işlem uygulanmayan sol gözden elde edilen değere bölünerek bağıl geçirgenlik değeri hesaplanmıştır. Her bir ölçüm elde edilen geçirgenlik değerleri kaydedilerek, çalışma süresince her bir grubun geçirgenlik değerindeki değişim incelenmiştir. Grupların tedaviye cevabının incelenmesinde, tedavi sonrası 1. hafta (3. ölçüm) ve 1. ayda yapılan ölçümlerin sonuçları, DRP hastalık modeli oluşturulduğunda alınan ölçümlerle (2. ölçüm) karşılaştırılmıştır. Çalışma süresince gruplardan elde edilen FFFM ölçüm sonuçları Tablo 4.19.'de, ölçüm sonuçlarının grup içi karşılaştırmalarının istatistiksel sonuçları Tablo 4.20.'de sunulmuştur. Çalışma süresi boyunca grupların FFFM değerlerindeki değişim Şekil 4.27.'de sunulmuştur.

Tablo 4.19. FFFM değerlerine ilişkin istatistiksel analiz sonuçları

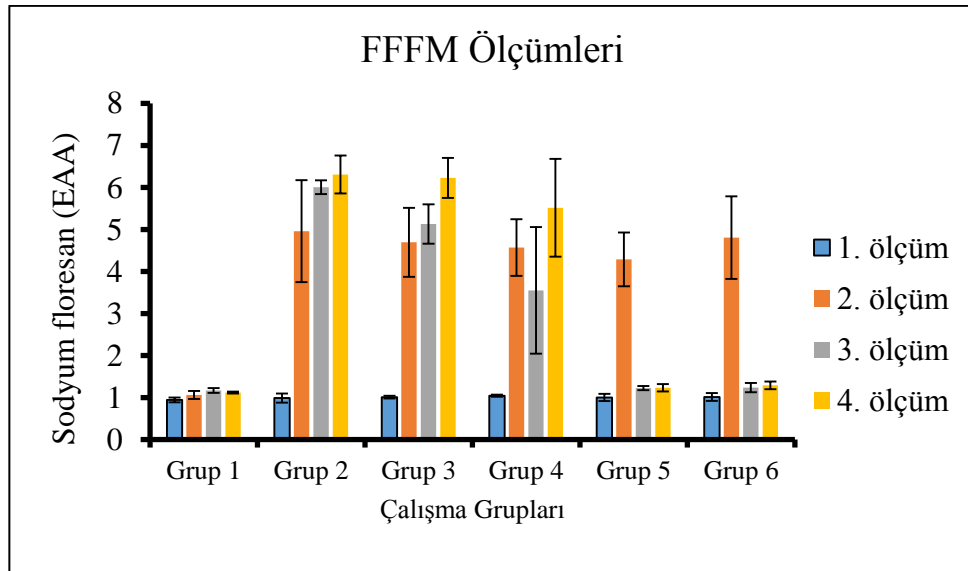
Grup		ö1	ö2	ö3	ö4
1	Ortanca	0,94	1,06	1,17	1,12
	Minimum	0,90	0,99	1,13	1,10
	Maksimum	0,98	1,13	1,21	1,14
2	Ortanca	1,05	4,48	5,94	6,27
	Minimum	0,86	4,07	5,89	5,88
	Maksimum	1,06	6,34	6,19	6,78
3	Ortanca	1,01	4,55	5,25	6,34
	Minimum	0,98	3,96	4,61	5,71
	Maksimum	1,04	5,58	5,53	6,64
4	Ortanca	1,05	4,71	3,75	5,65
	Minimum	1,01	3,67	1,71	4,03
	Maksimum	1,07	5,19	5,00	6,73
5	Ortanca	1,01	4,12	1,21	1,22
	Minimum	0,92	3,70	1,18	1,15
	Maksimum	1,08	5,20	1,30	1,35
6	Ortanca	1,01	4,68	1,23	1,30
	Minimum	0,92	3,90	1,12	1,18
	Maksimum	1,13	5,97	1,37	1,39

ö1: 1.ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. Ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3.Ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4.ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)

Tablo 4.20. Grupların, 2., 3. ve 4. ölçüm zamanlarındaki FFFM değerlerinin, 1. ve 2. ölçüm zamanındaki FFFM ölçüm değerleri ile karşılaştırmaları için p değerleri

Grup-1	ö2	ö3	ö4
ö1	0,180	0,180	0,180
ö2		0,180	0,180
Grup-2	ö2	ö3	ö4
ö1	0,109	0,109	0,109
ö2		0,285	0,285
Grup-3	ö2	ö3	ö4
ö1	0,109	0,109	0,109
ö2		0,285	0,109
Grup-4	ö2	ö3	ö4
ö1	0,068	0,068	0,068
ö2		0,273	0,144
Grup-5	ö2	ö3	ö4
ö1	0,068	0,068	0,068
ö2		0,068	0,068
Grup-6	ö2	ö3	ö4
ö1	0,068	0,068	0,068
ö2		0,068	0,068

ö1: 1. ölçüm (tavşan gözlerine çalışmanın ilk günü yapılan kontrol muayenesi), ö2: 2. ölçüm (DRP hastalık modelinin geliştirilmiş olduğu muayene), ö3: 3. ölçüm (tedavi sonrası 1. hafta muayenesi), ö4: 4. ölçüm (tedavi sonrası 1. ay muayenesi)



Şekil 4.27. Grupların FFFM ölçümlerinin ortanca değerlerinin çalışma süresince değişimi

5. TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Tez çalışmaları kapsamında yükleme ve salım çalışmalarında asetazolamid miktarının tayininde kullanılacak yöntemin doğruluğunun, tekrarlanabilirliğinin ve kesinliğinin teyid edilmesi için analitik yöntem validasyon çalışmaları yapılmıştır. ACZ'nin bu çalışmalardan elde edilen numulardan tayininde kullanılan yöntemler analitik yöntemin geçerliliği kabul kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

Analitik yöntem parametrelerinin validasyonunda, doğrusallığın hesaplanmasında çalışılan konsantrasyon aralığında, determinasyon katsayısı ($R^2 = 0.99349$) değerinin 1'e yakın olması, değişkenler arasındaki ilişkinin güçlü olduğunu (304, 305) ve doğrusal olduğunu göstermektedir.

Diğer analitik yöntem parametreleri olan doğruluk, kesinlik ve dayanıklılık için yapılan validasyon çalışmaları Bölüm 3.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Analitik yöntemle ilişkin validasyon parametrelerinin geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olması ve varyasyon katsayılarının (VK) %2'nin altında olması gerekmektedir (305). Doğruluk çalışmalarından elde edilen bağıl hata %1,5'un altında, ve geri kazanım değerleri %98-102 arasındadır (Bkz. Tablo 4.1). Gün içi ve günler arası kesinlik ve dayanıklılık çalışmalarından elde edilen bağıl hata değerleri %2'nin altında bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.2.- Tablo 4.4.).

Sonuç olarak validasyon çalışmalarından elde edilen bulgular asetazolamid tayininde kullanılan yöntemin doğru, kesin ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

5.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirme Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında intravitreal uygulanmak üzere, 1 ay süresince tedavi edici etki sağlayabilecek asetazolamid yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı bir

sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteminin, *in vitro* ve *in vivo* DRP hastalık modelinde anlamlı düzeyde tedavi edici etki göstermesi, herhangi bir toksik ve allerjik etki göstermemesi gerekmektedir. Ayrıca geliştirilen nanopartiküler sistemin DRP tedavisinde halen kullanılmakta olan tedaviyle aynı düzeyde etkili olması ve etkin maddenin çözelti formundan da anlamlı derecede daha yüksek etki göstermesi hedeflenmiştir. Bu özellikleri sağlayacak asetazolamid yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin oküler biyodağılımının ve biyolojik bariyerleri aşabilme özelliğinin yüksek olması, uzun süreli ilaç salımı yapabilmesi, biyouyumlu ve biyobozunur olması, toksik ve allerjik reaksiyona yol açmaması gerekmektedir.

5.2.1. Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Parametrelerinin Belirlenmesi

Arka segment hastalıklarının tedavisinde ilacın intravitreal yolla uygulanması kesin etki edeceği anlamına gelmemektedir (306). Hedef dokuda etkin terapötik dozun sağlanabilmesi için, intravitreal uygulama sonrası, ilacın göz dokularında da dağılması ve retina dokusuna ulaşması gerekmektedir. İlacın göz dokularında dağılımı ve retinaya ulaşımı ise vitreusta yeterli süre kalabilmesine ve arka segmentteki bariyerleri başarıyla aşabilmesine bağlıdır.

Intravitreal uygulanan nanopartiküllerin retinaya geçebilmesi için vitreusta yeterli bir süre kalabilmesi ve bu sürede retinaya difüze olması gerekmektedir. Retinaya geçmeden önce ILM sınırına gelip burada biriken nanopartiküller, ILM'yi geçerek iç retina katlarına ilerlemesi gerekmektedir. İç ve dış nükleer tabakalar, iç ve dış pleksiform tabakalar ve interfotoreseptör matriks nanopartikül geçişinde bariyer görevi görebilecek diğer yapılardır. İlacın RPE'e ulaşması hedeflenmişse, DLM'ı ve subretinal alanı da başarılı bir şekilde aşması gerekmektedir. ILM yoluyla retinaya geçişin bir diğer alternatifi de Müller hücre aracılı transferdir. Nanopartiküllerin vitreustaki dağılımını ve tüm bu bariyerleri aşabilmesini belirleyen temel faktörler nanopartikülün boyut, yüzey yükü gibi fizikokimyasal özellikleridir. Bu sebeple nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal özelliklerinin optimizasyonu hem ilacın göz içinde dağılımını ve hedef dokuya ulaşımını kolaylaştırır hem de irritasyon gelişimi açısından da belirleyicidir (275). Ayrıca nanopartikül geliştirilme sürecinde kullanılan parametreler nanopartikülün boyut ve yüzey yükü üzerine de

etkilidir. Bisht ve arkadaşları tarafından intravitreal protein taşınımı için geliştirilen PLGA nanopartiküllerinde organik faz hacminin artırılıp polimer konsantrasyonu azaltılmasıyla nanopartikül boyutunun düştüğü bildirilmiştir. Öte yandan polimer konsantrasyonundaki artışın ve organik faz hacmindeki artışın zeta potansiyel değerini arttırdığını da rapor etmişlerdir (14).

Tez çalışması kapsamında geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin vitreusta ve RPE hücrelerindeki KA enzimlerini inhibe etmesi, retina tabakalarındaki AQP kanalları üzerinde de etkili olması hedeflenmiştir. Bu nedenle geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin vitreusta yeterli süre kalarak hem retina tabakalarında ilerlemesi hem de subretinal alanı aşarak RPE hücrelerine ulaşabilmesi beklenmektedir. Bu amaçla literatürdeki veriler incelenerek 200-300 nm boyutlarında anyonik yapıda bir nanopartikülün bu dağılım için uygun nanopartikül özellikleri olduğu tespit edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda istenilen özelliklere sahip nanopartiküller bir sistemin geliştirilmesi için iki farklı polimer (PHBV ve CD) seçilerek ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalar kapsamında PHBV ile bir nanopartikül, CD ile 4 farklı nanopartikül formülasyonu geliştirilerek partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve yükleme verimi açısından karşılaştırılmıştır. (Bkz. Tablo 4.5.) Geliştirilen PHBV nanopartikülleri (Bkz. Şekil 4.4.) 342 nm boyutlarında, % 49,41 yükleme verimine sahiptir. Boyut açısından PHBV NP'ler istenen hedefleri karşılayamadığından polimer olarak CD kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu kapsamda literatürde sıklıkla kullanılan 4 farklı yöntem seçilmiştir. İlk üç yöntemde polimer olarak 2HP- β -CD, dördüncü yöntemde ise γ CD tercih edilmiştir. İlk yöntemde, EDGE kullanılmazken, diğer yöntemlerde çapraz bağlayıcı olarak EDGE kullanılmıştır. Dört farklı yöntemle hazırlanan CD NP'lerin karakterizasyon çalışmalarından elde edilen partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, polidispersite indeksi ve verimlilikleri karşılaştırıldığında (Bkz. Tablo 4.5.) NP'lerin yüzey yüklerinin -25.2 ± 0.4 ile $-34.7 \pm 0,6$ arasında değiştiği görülmüştür. Bu bulgular dört farklı yöntemle hazırlanan CD-NP'lerin negatif yüke sahip olması sebebiyle, tez hedeflerini karşıladığını göstermektedir. Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları karşılaştırıldığında (Yöntem 1: $195,1 \pm 5,05$ nm; Yöntem 2: $513,8 \pm 17,3$ nm; Yöntem 3: 1760 ± 59 nm; Yöntem 4: $662,2 \pm 24,2$ nm) sadece Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan NP'lerin hedeflenen NP boyutunu karşıladığı tespit edilmiştir. Tez

çalışmaları kapsamında partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve verimlilik parametreleri açısından hedeflenen kriterleri sağladığı için ACZ yüklü CD-NP'lerin hazırlanmasında Yöntem 1 seçilmiştir.

5.2.2. ACZ-CD-NP'lerin Karakterizasyonu

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen ACZ-CD nanopartiküllerin DLS analizi sonuçlarına göre partikül büyüklüğü 238 ± 16 nm ve polidispersite indeksi 0,160 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7.). Nanopartiküllerin yüzey yükü -16 ± 3.94 mV, yükleme verimi ise %50 olarak tayin edilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde ACZ yüklü CD nanopartiküllerin düzgün ve küresel formda olduğu izlenmiştir (Şekil 4.8.). FTIR spektrumlarının karşılaştırılması sonucu karakteristik piklerde görülen çakışma nanopartiküllere asetazolamidin yüklendiğini göstermektedir.

Nanopartikül Boyutu

Partikül boyutu hem vitreustaki dağılımı hem de retinaya geçişi etkileyen bir faktördür. Retina hastalıklarının tedavisine yönelik olarak geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hem vitreusta dağılımı ve retina dokusuna geçişi sağlayabilecek boyutlarda olması gerekir. Vitreus kolajen ve glikozaminoglikanların oluşturduğu bir ağ yapısındadır. Bu ağda varolan porlar yaklaşık 500-1000 nm boyutlarında olduğu (274) için nanopartiküler sistemlerin vitreustaki difüzyonu sağlayabilmeleri için 500 nm'den daha küçük olmaları gerekmektedir. 200-300 nm boyutlarındaki nanopartiküller vitreusta serbest olarak hareket ederken, 500 nm'nin üzerinde nanopartikül hareketi yavaşlamaktadır. Boyutları 1000 nm'nin üzerinde olan nanopartiküllerin vitreustaki hareketi sınırlanmaktadır. Xu ve ark. (277), 1190 nm olan polistren nanopartiküllerin sıgır vitreusunda hareketsiz kaldıklarını göstermiştir.

Sakurai ve ark. (307), 200 ve 50 nm boyutlarındaki polimerik nanokürelerin (fluorosan işaretli polisteren) intravitreal dağılımını incelemiştir. Enjeksiyondan 1 ay sonra 2 µm boyutlarındaki nanopartiküllerin vitreusta belirgin bir opasiteye yol açtığı bildirilirken, 200 veya 50 nm boyutlarındaki nanopartiküllerin vitreusta homojen bir dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. 200 nm ve daha küçük boyutlu olan

nanopartiküllerin enjeksiyondan 2 ay sonra retinada izlendiği, mikrobeyutlu partiküllerin ise trabeküler ağda ve vitreusta tespit edildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar mikron düzeyindeki partiküllerin retinaya geçiş için çok büyük olduğunu bildirmişlerdir. Vitreustaki yarılanma süreleri 2 µm, 200 nm ve 50 nm boyutundaki nanopartiküller için sırasıyla 5,4±0,8 gün, 8,6±0,7 gün ve 0,1±1,8 gün olarak tayin edilmiştir.

Vitreusta difüzyon yaparak ILM sınırına gelebilen nanopartiküller, ILM veya Müller hücreleri aracılığıyla retina tabakalarında geçebilirler. ILM, Müller hücrelerinin basal membranının vitreus korteksiyle birlikte oluşturduğu bir yapı olup 10-30 nm boyutunda porlara sahiptir (308, 309). Kalınlığı retinanın farklı bölgelerinde değişiklik göstermekle birlikte yaklaşık 4 mikrondur. Yaşla kalınlığı artar, diyabet başta olmak üzere inflamatuvar ve iskemik pek çok hastalıkta kalınlık artışı bildirilmiştir. ILM'den molekül geçişi temelde fagositoz yoluyla olur. Vitreustan ILM yoluyla retinaya geçişte partikül boyutu ve yük önemlidir. Bununla birlikte ILM'den geçiş için, nanopartikülün boyutu ile alakalı olarak bir eşik değeri mevcut değildir. Geçiş için uygun olan boyut değeri nanopartikülün diğer fizikokimyasal özelliklerine göre değişebilmektedir (281). Öte yandan retinaya geçişte ILM'yi *bypass* ederek direkt dış retina tabakalarına ulaşım sağlayacak alternatif yollar da mevcuttur. Nanopartiküllerin vitreustan retinaya geçişinde ILM'yi *bypass* ederek Müller hücreleri aracılığı ile iç tabakalara ulaştıkları da gösterilmiştir (279). Koo ve ark. (279), 326 nm boyutlarındaki HSA nanopartiküllerin Müller hücreleri tarafından endositoz ve eksositoz yoluyla alınarak dış nükleer tabaka ve fotoreseptör tabakasına kadar ilerlediğini göstermiştir. Çalışmada, nanopartiküllerin Müller hücrelerindeki lokalizasyonunun hem dış pleksiform hem de iç nükleer tabaka seviyelerinde gösterilebildiği bildirilmiştir.

ILM'yi aşan nanopartiküller retinanın dış katlarına doğru ilerler. Küçük nanopartiküllerin (<500 nm) retina tabakalarında ilerlemesi endositoz yoluyla olurken büyük boyutlu (0.4-2 mikron) nanopartiküller için fagositoz yoluyla gerçekleşir (310-312). Bu durum RPE'e hedeflenmiş manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı *Xenopus* embriyolarında ve zebrafish'lerde yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (313).

Bourges ve ark. (242), farklı boyutlardaki (140 nm ile 310 nm arasında değişen) nanopartiküllerin intravitreal uygulama sonrasında retinanın tüm tabakalarına ve RPE'e ilerledikleri göstermişlerdir. Nanopartiküllerin 4 ay sonrasına kadar retina dokusunda kaldıkları ve kontrollü ilaç salımı yaptığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada boyutları 50 nm'den 643 nm'ye kadar değişen farklı büyüklüklerdeki nanopartiküllerin retinada dış katlara kadar ilerlediği gösterilmiştir (307, 314). Bu sonuçlar intravitreal uygulama sonrası hedef dokuya ulaşma konusunda boyutun tek belirleyici özellik olmadığını yüzey yükü, stabilite gibi diğer faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Nitekim Koo ve ark.'nın çalışmasında (279), 344 nm boyutlarında HSA-HA hetero nanopartiküllerin vitreus ve retinadaki hareketi, 200-300 nm boyutlarındaki HA ve HSA nanopartikülleri ile benzer bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonucu, 350 nm'nin altındaki nanopartikül büyüklüğünde, vitreus ve retinadaki nanopartikül hareketlerinin primer olarak partikülün yüzey yükünden etkilenmesi şeklinde yorumlamışlardır.

Nanopartikül Yükü

Nanopartiküllerin göz dokularındaki hareketinde en fazla etkili olan fizikokimyasal özellik nanopartiküllerin yüzey yüküdür (315, 316). İntravitreal uygulanan nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemin hedef retina dokusuna ulaşması için vitreus ve diğer dokularda ilerleyerek retina hücreleri içine alınması gerekmektedir. Bu basamaklar, nanopartikül ve yüzey yüküne sahip biyolojik moleküller arasındaki elektrostatik çekim kuvveti tarafından aşılır (6). Nanopartiküllerin yüzey yükü hem vitreustaki difüzyon süresince hem de retina tabakalarına geçişte etkilidir.

Literatürde farklı yüzey yüklerine sahip nanopartiküllerin vitreus içindeki hareketlerinin *ex vivo* göz modelinde çalışıldığı pek çok çalışma vardır. Peters ve ark., katyonik lipoplekslerin, vitreus yapılarına bağlanarak hareketsiz kaldığını ama pegilasyon sonrası agregasyon ve vitreus biyopolimerlerine bağlanma sorununun çözümlendiğini bildirmişlerdir (317). Xu ve ark. (277), amin gruplarıyla kaplanmış pozitif yüklü polisteren nanopartiküllerin sığır vitreusunda hareketsiz kalırken, karboksil grubuyla kaplanmış negatif yüklü P polisteren nanopartiküllerin vitreusta serbestçe hareket ettiğini bildirmişlerdir. Eriksen ve ark. (318), katyonik lipozomların

nötral ve anyonik lipozomlara göre vitreus boyunca difüzyon katsayısının belirgin olarak düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Pitkanen ve ark. (319), sığır gözüne intravitreal uygulanan poli-L-lizin, polietilenimin ve katyonik lipozomların ILM'yi geçerek retinaya ulaşmak yerine ILM'nin yüzeyine bağlanarak biriktiğini bildirmişlerdir. Tüm *ex vivo* çalışmalar, katyonik nanotaşıyıcıların vitreustaki hareketi azalttığını ve geciktirdiğini, ILM'den geçişi de zorlaştırdığını göstermektedir. Bu sonuç, pozitif yüklü nanopartiküllerle negatif yüklü ILM ve vitreus arasındaki elektrostatik çekim kuvveti ile açıklanmaktadır (240).

Koo ve ark. (279), benzer boyutlarda, farklı yüzey yüküne sahip moleküllerin intravitreal uygulama sonrası göz içindeki dağılımını incelemişlerdir. Çalışmada katyonik (PEI ve GK), anyonik HA, ve insan serum albümini (HSA) ve heterojen polietilenimin, glikol kitosan (GK) (PEI/GK, HSA/GH ve HSA/HA) nanopartiküllerinin vitreustaki hareketleri izlenmiştir. Çalışmada, 316 nm boyutlarında pozitif yüklü polietilenimin (PEI) nanopartiküllerin vitreus sıvısına yapışarak, enjeksiyondan 24 ve 72 saat sonra hala enjeksiyon alanında kaldıkları gösterilmiştir. Aynı çalışmada 16,4 mV zeta potansiyel ve ortalama 229,1 nm boyutlarına sahip olan diğer katyonik nanopartikül olan glikol kitosan'ın (GK) ise, vitreusta hareket ederek ILM yüzeyine kadar ulaştıkları ve burada biriktikleri gözlemlenmiştir. Araştırmacılar iki katyonik nanopartikülün dağılım özellikleri arasındaki bu farkın, GK'nın yapısındaki glikolden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Yazarlar, glikolün polietilen glikol'e benzer bir etki göstererek kitosanın yapısındaki aminleri bloke ettiğini ve vitreustaki negatif yüklü moleküllerle bağlanmayı engellediğini savunmuşlardır. Benzer katyonik yüke sahip 271,1 nm boyutlarında ve +20,7 mV zeta potansiyele sahip heterojen PEI/GC nanopartiküller ve 293,3 nm boyutlarında ve -1,9 mV zeta potansiyele sahip heterojen HSA/GC nanopartiküller de ILM yüzeyinde birikerek retinanın iç katlarına ilerleyememişlerdir. Bu sonuç, literatürde daha önce 11,7 mV zeta potansiyele sahip katyonik HSA'ların intravitreal uygulanması sonucunda elde edilen verilerle uyumludur (294). Öte yandan çalışma da 213,4 nm boyutlarında, -26,2 mV zeta potansiyele sahip anyonik HA nanopartiküllerin ve 326,3 nm boyutlarında, 20,9 mV zeta potansiyele sahip anyonik HSA

nanopartiküllerin hem vitreusta serbestçe hareket ettikleri hem de retinaya geçerek retina dokusunda derin katlara ilerlemelerinin sorunsuz olduğu gösterilmiştir. TEM görüntüleriyle anyonik nanopartiküllerin retina katları boyunca ilerlemesini ILM'yi klatrin-aracılı endositoz yoluyla geçtiklerini bildirmişlerdir. Öte yandan anyonik nanopartiküller hem Müller hücrelerinde farklı tabakalarda hem RPE'de gösterilmiştir. Bu sonuç araştırmacılar tarafından, nanopartiküllerin vitreustan retina geçişinde Müller hücrelerinden endositoz ve ekzositoz mekanizmalarının etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

344,8 nm boyut ve -23,3 mV zeta potansiyele sahip heterojen HA/HSA nanopartiküllerin de vitreusta serbestçe hareket ettikleri, retinanın dış tabakalarına ilerleyerek RPE tabakasına ulaştıkları gösterilmiştir. Bu durum 350 nm'den daha küçük nanopartiküllerin vitreustaki hareketlerinin yüzey yükü tarafından belirlendiği şeklinde yorumlanmıştır (279). Nanopartikül yükünün, nanopartikülün intavitreal dağılıma ve retina dokularına geçiş etkileri konusundaki literatür bilgileri incelendiğinde genel kanaat negatif yüklü nanopartiküllerin daha etkili olduğu yönündedir. Yüzey yükünün bu belirleyici etkisi, vitreustaki ve retinadaki hücre membranlarındaki negatif yüklü moleküllerin, katyonik nanopartiküllerle etkileşime girmelerinden kaynaklanmaktadır (320).

Tez çalışmaları kapsamında, *in vivo* çalışmalarda hastalığın seyri *in vivo* olarak retina muayene cihazlarıyla takip edildiği için çalışma süresinde herhangi bir muayene anında tavşanların feda edilmesi gerekmemiştir. Bu nedenle de, nanopartikülün göz dokularında dağılımını inceleyen bir çalışma yapılamamıştır. Fakat, tez çalışmaları kapsamındaki veriler incelendiğinde, geliştirilen NP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin vitreusta difüzyon ve retina tabakalarına geçiş için tanımlanan kriterleri sağladığı görülmektedir. *In vivo* sonuçlarda da hedeflenen klinik cevap elde edilmiştir. Bu sonuçlarla, geliştirilen NP'lerin göz içi dokulara dağılımının, vitreusta difüzyonunun ve retina tabakalarına ve RPE'YE geçişinin başarılı olduğunun bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

İntravitreal enjeksiyonlarda, hedef dokuda istenen ilaç konsantrasyonunun sağlanabilmesi ve bu etkinin istenen süre korunabilmesi temelde iki faktöre bağlıdır:

ilacın uygulama alanındaki kalış süresi ve ilacın hedef dokuya ulaşımı. İlacın vitreusta kalış süresi, retinadaki etkin maddenin dozunu belirleyen çok önemli bir faktördür. Vitreustaki kalış süresi, ilacın oküler dokularda biyodağılımı, uygulanan ilaç miktarı ve ilacın vitreustan eliminasyon hızı tarafından belirlenir (275). Vitreus çok küçük ve kısıtlı hacme sahip bir doku olduğundan intravitreal uygulamalarda uygulanabilecek hacim miktarı belirli sınırlarda olmalıdır (yaklaşık 100 mikrolitre) (279). Bu sebeplerle intravitreal kontrollü salım sistemleri ile uzun süre etki ederek intravitreal enjeksiyon sıklığını azaltmak için, mümkün olan en yüksek güvenli dozun verilebilmesi önemlidir. Bu verilen dozun da uzun süre etkin ilaç salımı yapabilmesi ve vitreusta hemen degradasyona uğramaması gerekmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıma sistemleri için bu hedefin sağlanmasında yükleme verimi, salım özellikleri ve degradasyon süresi çok önemli parametrelerdir.

Salım Çalışmaları

CZ yüklü nanopartiküllerin salım profilinde, ilk patlama (*burst*) salımının ardından kontrollü bir şekilde devam ettiği, geri kalan miktarın salımının yavaş yavaş sabit fazda gerçekleştiği ve ortamdaki ilaç konsantrasyonunu 0,4 mg civarında sabit olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.). Asetazolamidin maküler ödem tedavisi konusunda literatürde sadece olgu bazlı çalışmalar vardır. Bu sebeple intravitreal yolla uygulanan asetazolamidin maküler ödem tedavisindeki etkin konsantrasyonu hakkında herhangi bir çalışma sonucu bulunmamaktadır. Literatürdeki sadece asetazolamidin intravitreal uygulamasının toksik olmayan en yüksek dozunun 0,5 mg olduğuna ait veri bulunmaktadır (201). Tez çalışmaları kapsamında *in vitro* toksisite ve etkinlik çalışmalarından elde edilen veriler, literatürde asetazolamidin toksik dozu ile ilgili verilerle birlikte değerlendirilerek hazırlanan ACZ-CD NP'lerde yüklenen ilaç miktarı 0,5 mg olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, 3 hafta sonraki salım sonuçlarında ortalama asetazolamid miktarının ortalama 0,4-0,5 mg arasında olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.10.).

Degradasyon Çalışmaları

Degradasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar sıcaklık arttıkça nanopartiküllerin degradasyon oranının arttığını göstermiştir. Nanopartiküllerde ACZ etkin maddesinin varlığı daha stabil bir degradasyon oluşmasını sağlamıştır (Şekil

4.9.). CD nanopartiküllerin 4°C'deki degradasyon profilinde belirli zamanlarda gözlenen artmalar degradasyon ürünlerinin agregasyonu ile açıklanmıştır.

Oküler kullanım amacıyla siklodekstrin bazlı nanopartiküllerin, etkin maddenin kontrollü salımını sağlayarak oküler biyoyararlanımını arttırdığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (261, 253). Zhang ve ark.'nın çalışmasında (322), göz hastalıklarının tedavisine yönelik olarak geliştirilen naringenin yüklü sülfobütiler- β -siklodekstrin/kitosan nanopartikülleri (Nag-CD/CS-NPs) geliştirilmiş ve göz hastalıklarının tedavisinde kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında, küresel formda $446,4 \pm 112,8$ nm boyutlarında ve $+22.5 \pm 4.91$ mV zeta potansiyele sahip nanopartiküller geliştirilmiştir. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalarda Nag-CD/CS-NPs'lerin, uzamış naringenin salımı yaptığı ve naringenin biyoyararlanımını arttırdığı gözlenmiştir. Araştırmacılar bu bulgulara dayanarak CD/CS-NP'lerin, çözünürlüğü düşük ilaçların biyoyararlanımını arttırmak için iyi bir seçenek olabileceğini ileri sürmüştür.

5.3. Geliştirilen ACZ-CD NP'lerin Göz Dokularında Toksisitesinin İncelenmesi

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin *in vitro* ve *in vivo* toksisite incelemeleri yapılmıştır. *İn vitro* toksisite MTT testi ile değerlendirilmiş, *in vivo* toksisite çalışmaları kapsamında da ön segment ve arka segment muayene sonuçları ve göz içi basıncı ölçümleri değerlendirilmiştir.

Gözün ön segment ve arka segment kompartmanları immün imtiyazlı alanlardır ve sistemik dolaşımdaki antijenlere karşı korunaklıdır (45, 47). Gözdeki immün sistem vücudun diğer organlarından farklı özelliklere sahiptir ve buna bağlı olarak göz içinde gelişen inflamatuvar cevap vücudun diğer organlarından farklı bir seyir izler (63). Vitreus çok yavaş yenilenen jelimsi bir yapıdır. Bu nedenle göz içinde gelişen pH değişiklikleri veya açığa çıkan toksik ürünler kolayca kontrol edilemez ve oküler dokularda harabiyete yolaçabilir (323). Bu nedenle göze uygulanan biyomateryaller gözde çok ağır sonuçlara sebep olabilecek inflamatuvar reaksiyonlara yolaçabilir (7,236).

Oftalmik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilme sürecinde hayvan çalışmalarından önceki aşamalarda *in vitro* modellerin kullanılması çok önemli bilgiler sağlamaktadır (324). Hücre kültürü çalışmaları, yeni ilaçların ve ilaç taşıma sistemlerinin toksisite ve immünojenitesinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (305). ISO 10993-5 standardına göre bir maddenin toksik sayılabilmesi için, hücre canlılığını %30 oranında azaltması gerekmektedir (326). Tez çalışmaları kapsamında *in vitro* toksisite testleri, HRMEC hücre hattında MTT testleri ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda boş CD nanopartikül, serbest asetazolamid ve asetazolamid yüklü CD nanopartiküllerin HRMEC hücrelerinde oluşturduğu toksik etkiler incelenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında asetazolamid konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin de arttığı izlenmiştir. 250 µg/mL konsantrasyonda hücreler yaklaşık %90 canlılık göstermektedir. Bu sonuç, hazırlanan nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin oldukça düşük olduğunu ve *in vivo* uygulamalar açısından uygun olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 4.11., Tablo 4.6.).

İntravitreal enjeksiyon sonrasında gelişebilecek toksik ve alerjik etkilere bağlı olarak, göz içinde inflamatuvar reaksiyon, göz içi basıncında değişiklikler ve retina ve optik diskte toksik etkiler gelişebilir. İntravitreal uygulama sonrasında gelişebilecek inflamasyona bağlı olarak, ön kamarada fibrin materyali, hipopiyon, korneal ödem arka kamara muayenesinde vitreusta bulanıklık gelişebilir (236, 327). Ayrıca retinada dekolman, vitreus hemorajisi ve optik disk atrofsi gibi toksik etkiler de gelişebilir (10). Bu nedenle bu etkilerinin değerlendirilebilmesi için tüm bu bulgulara yönelik takip çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bu etkiler intravitreal uygulanan nanopartiküllerin *in vivo* toksisite çalışmalarında ön segment ve arka segment muayene bulguları ve göz içi basıncı ölçümleri değerlendirilmiştir.

Tez çalışmaları kapsamında intravitreal uygulama sonrası Tablo 3.4.'te verilen iş planına göre yapılan tüm kontrollerde ön segment muayenesinde; ön kamarada, fibrin membran, arka sineşi, hipopiyon ve korneal ödem varlığının değerlendirilmesi açısından takip yapılmıştır. Ön segment muayenesinde korneada veya ön segmentte endoftalmi bulguları da takip edilmiştir (Bkz. Şekil 4.18.) Gruplardan hiçbirinde ön segmentte inflamasyonla veya endoftalmi ile ilişkili bulgu izlenmemiştir. Fundus muayenesinde, tavşanların tamamında vitreus berrak, fundus rahat izlenebilir olarak

tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.20.). Hiçbir grupta vitreusta, fundusun izlenmesine engel olacak bir bulanıklık izlenmemiştir. Arka segment muayenesinde intravitreal enjeksiyona bağlı olarak gelişebilecek diğer önemli komplikasyonlar olan optik atrofi, retina dekolmanı ve vitreus hemorajisi gelişimi açısından da takip yapılmıştır. Arka segment muayenelerinde, hiçbir tavşanda optik diskte solukluk, retina dekolmanı, vitreus hemorajisi veya endoftalmi ile uyumlu bulgu izlenmemiştir.

Retina dokusu beynin doğrudan uzantısıdır, tüm hücreleri post mitotik evrededir ve bu sebeplerle retina hücreleri göz içindeki herhangi bir metabolik değişikliğe karşı çok hassastır (328). Vitreusun çok yavaş yenilenen jelimsi bir yapıda olması sebebiyle pH değişiklikleri veya açığa çıkan toksik ürünler kolayca kontrol edilemez ve oküler dokularda harabiyete yol açabilir. Buna ek olarak, vitreus görme aksının tamamını kaplamaktadır. Pupilla aracılığı ile arka segmente geçen ışık ışınlarının retinaya ulaşması için vitreusun şeffaf olması gerekmektedir. İnflamatuar cevap sırasında açığa çıkan mediyatörlerin sebep olacağı bulanıklık ışık ışınlarının makülaya iletimini engelleyebilir. Bu nedenle göze uygulanan ilaçların sebep olabileceği inflamatuvar reaksiyon akut evrede vitreusta bulanıklığa sebep olarak görmeyi ciddi ölçüde etkiler. Kronik evreye geçen inflamatuvar reaksiyonlar, göz dokularında ağır ve kalıcı harabiyete sebep olabilir. Bu durum göz dokusunun kaybına veya görmenin tamamen kaybedilmesine yol açabilir. Bu nedenle oküler ilaç taşınmasına yönelik yeni sistemlerin geliştirilmesinde inflamatuvar reaksiyonların gelişiminin takibi ve önlenmesi bir zorunluluktur (7, 236, 323).

Live ark. (329), arka segment uygulamaları için geliştirdikleri, poliortoester nanopartiküllerini iki farklı konsantrasyonda hazırlayıp intravitreal olarak uygulamışlardır. Araştırmacılar her iki konsantrasyondaki nanopartüllerin tavşan gözlerine intravitreal uygulama sonrası *in vivo* toksik etkilerini, ön segment muayenesi ve göz içi basıncı ölçümleri ile takip etmişlerdir. Çalışma sonunda, ön segmentte fibrin materyali birikimi ve inflamatuvar cevap ile uyumlu bulgu izlemeyen araştırmacılar, göz içi basıncı ölçümlerinde de belirgin bir değişiklik izlemediklerini bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla poliortoester nanopartiküllerin intravitreal uygulamalar için güvenli olduğunu rapor etmişlerdir.

İntravitreal uygulanan nanopartiküler ilaç taşıma sistemlerinin incelenmesinde dikkate alınması gereken diğer önemli bir parametre de göz içi basıncı değerleridir (330). Tez çalışmaları kapsamında uygulanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin yol açabileceği göz içi basıncı değişikliklerinin takibi açısından tüm ölçüm zamanlarında göz içi basıncı ölçümü de yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.10. ve Şekil 4.19.). Ölçümler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde grupların hiçbirinde ilk muayene zamanında veya DRP hastalık modeli oluşturulduktan sonra göz içi basıncı ölçümlerinde anlamlı bir değişim olmadığı bulunmuştur. Hastalık modeli geliştirildikten sonra ACZ-CD-NP uygulanan grupta, göz içi basınç bir hafta sonra 15,45 mmHg ve bir ay 13,45 mmHg olarak ölçülmüştür. Bevasizumab uygulanan grupta da hastalık modeli geliştirildikten sonra ve tedavi uygulandıktan sonraki 1. Hafta ve 1. Ay sonra yapılan ölçümlerde göz içi basıncı ölçümlerinde anlamlı bir değişim izlenmemiştir. Benzer bir durum tedavi uygulanmayan DRP grubunda ve PBS grubunda da izlenmiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen ACZ-CD-NP uygulamasının bu çalışma kapsamında göz içi basıncı ölçümlerinde değişikliğe sebep olmadığını göstermiştir.

İntravitreal uygulanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler çok farklı mekanizmalarla göz içi basıncında değişikliklere sebep olabilir. Göz içindeki inflamatuvar cevap ve üveitler de göz içi basıncında düşüklüğe sebep olur (331, 332). İntravitreal nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, inflamatuvar reaksiyona yol açarak göz içi basıncında azalmaya yol açabilir. Bir diğer mekanizma ise nanopartiküllerin oküler dokulardaki dağılımıdır. İntravitreal uygulanan nanopartiküller boyutlarına ve yüzey yükü gibi diğer fizikokimyasal özelliklerine göre anterior veya posterior eliminasyona uğrar. Anterior yolla eliminasyona uğrayan nanopartiküller, trabeküler ağda ve aköz sistemde birikir. Trabeküler ağ ve silier cisim göz içi basıncının korunmasında çok önemli role sahiptir (333). Bu mekanizma ile intravitreal nanopartikül uygulaması sonrasında inflamatuvar reaksiyon gelişmeden de göz içi basıncı düşüklüğü gelişebilir. Zou ve ark., Hiyaloronik Asit (HA), polilaktik asit (PLA), polisteren (PS) ve poli-N-isopropilaminakrilat (PNIPAM) gibi farklı polimerler kullanarak hazırladıkları nanopartikülleri intravitreal uyguladıktan sonra göz içindeki dağılımlarını ve göz dokularındaki cevabı izlemişlerdir. PLA, PS ve PNIPAM uygulanan gruplarda, ön kamarada veya arka kamarada herhangi bir

inflatuar cevap gelişmeden göz içi basıncı yüksekliği geliştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu gruplardan alınan dokuların histolojik incelemelerinde, nanopartiküllerin trabeküler ağda biriktiğinin gösterildiğini rapor etmişlerdir (334).

İntravitreal uygulanmalardan sonraki takiplerde göz içi basıncı yüksekliği gelişebileceği de göz ardı edilmemesi gereken bir konudur. İntravitreal enjeksiyonlara bağlı kısa süreli veya kalıcı göz içi basıncı yüksekliği gelişimi çok bilinen bir yan etkidir (335, 336). İntravitreal enjeksiyondan sonra hem enjekte edilen etkin maddenin etkisine bağlı olarak hem de enjeksiyonun mekanik etkilerine bağlı olarak göz içi basıncındaki yükseklik gelişebilir (195). Etkin maddenin veya diğer yardımcı maddelerin trabeküler ağda birikimi, veya ilacın tetiklediği trabekülit göz içi basıncındaki yüksekliğine sebep olduğu düşünülen mekanizmalardan bazılarıdır (337, 338). Bu nedenlerle geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin göz içi basıncı üzerindeki etkileri önemli ve dikkatle izlenmeyi gerektiren parametrelerdir.

İntravitreal nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem uygulamalarına bağlı olarak gelişebilecek toksik ve alerjik etkiler dikkate alındığında, bu sistemlerin geliştirilmesinde en çok dikkate alınması gereken konulardan birinin toksik ve alerjik etkilere sebep olmamak olduğu aşıkardır (7,236,323). Vücuda uygulanan nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin hücre ve doku uyumunu etkilediği kanıtlanmıştır (339). Bu nedenle farklı polimerlerden oluşan nanopartiküllerin gözde oluşturacağı cevap da farklılık gösterecektir. Nanopartikülün özellikleri yumuşak dokudaki cevabın seyrini ve ciddiyetini belirler (352). Bu problemlerin önlenmesi için göze uygulanacak ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılacak polimerler özenle seçilmelidir (7, 236, 323). İntravitreal nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler ilaç moleküllerinin retinaya taşınmasında çok önemli bir role sahiptir. Kullanılan polimerler biyouyumluluğun artırılması, kimyasal stabilite, degradasyon süresinin modifikasyonu, çözünürlüğün artırılması gibi pek çok üstünlük sağlar (241). Dolayısıyla, oküler kullanım amacıyla geliştirilen biyomateryallerin karakterizasyonunun ve toksisite incelemelerinin yapılması zorunluluk arz etmektedir (343). Degradasyon ürünleri de toksik etkilere sebep olabileceğinden biyoparçalanır ürünler için de toksisite incelemeleri önemlidir PLGA, FDA onayı olan güvenli bir polimer olmasına rağmen parçalanması sırasında inflamatuvar reaksiyon gelişimi

bildirilmiştir. Sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen nanopartiküler formülasyonların potansiyel toksitesi konusunda giderek artan bir tedirginlik vardır (344).

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen nanopartiküler sistemde taşıyıcı polimer olarak siklodekstrinler tercih edilmiştir. Siklodekstrinler FDA tarafından GRAS kabul edilmiş ve çok uzun süredir farmasötik teknoloji alanında geçirgenliği, stabiliteyi ve dispersiyonu arttırmak için çok uzun süredir kullanılan doğal polisakkaritlerdir. Göz hastalıklarına yönelik ilaçlarda çözünürlüğün ve geçirgenliğin artırılmasında ve irritasyonun azaltılmasında siklodekstrinler sıklıkla tercih edilmektedirler. Piyasada varolan ve faz çalışmaları devam eden pek çok oftalmik preparatın yapısında siklodekstrinler yer almaktadır (345).

5.4. Geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin DRP Tedavisinde Etkinliğinin Belirlenmesi

5.4.1. *In vitro* Etkinlik Çalışmaları

Hücre kültüründe geliştirilen hastalık modelleri, yeni geliştirilen ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliklerinin belirlenmesinde ilk aşamada faydalı bilgiler sağlamaktadır. Bu çalışmalar gereksiz masraf, süre ve iş gücü kaybını önlemenin yanında çalışmalarda kullanılacak hayvan sayılarını da azaltmaktadır. Bu amaçla Avrupa Birliğinde çalışmalarda kullanılacak hayvan sayılarının azaltılması amacıyla çok kesin ilkeler belirlemiştir (325).

Retina hastalıkları ile ilgili hücre kültürü çalışmalarında, primer hücre kültürleri veya hücre hatları kullanılabilir (289). Retina primer hücre kültürü olarak insan ve sığır, maymun, tavşan, sıçan, fare gibi farklı hayvan türlerinden elde edilen hücreler kullanılabilir (346). Primer hücre kültürlerinin insandan sağlanması retina dokusunda kalıcı harabiyete yol açabileceği için etik açıdan çok uygun değildir. Ayrıca primer hücre kültürlerinde, kontaminasyon, farklılaşma, ve hücrenin tanımlanması gibi sorunlar vardır. Bu nedenlerle yeni ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemlerin etkilerinin incelenmesinde çoğunlukla retina hücre hücre hatları tercih edilmektedir (346). DRP

etiopatogenezinde KRB harabiyeti en önemli mekanizmadır. KRB harabiyetinin hücre düzeyindeki modelinin geliştirilmesinde, iç KRB veya dış KRB harabiyeti modeli geliştirilebilir (347). Bu amaçla, RPE veya retina endotel hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır. İç KRB harabiyeti, DRP patogenezinde en sık etkilenen bariyer olduğundan sıklıkla iç KRB hücre kültürü tercih edilmektedir. Literatürde *in vitro* DRP hastalık modeli oluşturmak için primer sıgır retina endotel hücre kültürünün (BRCECs), ölümsüz sıçan retina endotel hücre hattının (TR MEC) veya insan retina endotel hücre hattının (HRMEC) kullanıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (289, 346). Tez çalışmaları kapsamında insan retina endotel hücre hattı (HRMEC) tercih edilmiştir.

Diyabetik retinopati hücresel düzeyde incelediğinde ağırlıklı olarak KRB'inin hasara uğraması ve bu hasar sonucu bariyer fonksiyonunun bozularak damar geçirgenliğinin artması söz konusudur (348). Bu geçirgenlik artışının sonucu olarak makülada göz dokularına sıvı sızar ve retina dokusunda hücre içinde ve hücrelerarası boşlukta sıvı birikir. (47, 48). Geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin hücre kültüründeki etkinlik çalışmalarının yapılması amacıyla, HRMEC hücre hattında VEGF içeren besiyeri ile muamele edilerek, DRP hastalık modeli oluşturulmuştur (348) (Bkz. Şekil 4.11.) (Bkz. Tablo 4.8.).

Endotel gibi tek katmandan oluşan ve bariyer fonksiyonu özelliğine sahip hücreler, hücre tabakasının bütünlüğü ve hücresel bağlantılara bağlı olarak bir elektriksel rezistans oluşturur (349). Hücrelerin oluşturdukları bu elektrik rezistansı TEER ölçümleri ile tayin edilebilir (350). Transepitelyal/endotelyal elektriksel direnç, endotel hücreleri gibi bariyer fonksiyonuna sahip hücre hatlarında hücresel bağlantıların ve bütünlüğün değerlendirmesi için kullanılan invazif olmayan bir yöntemdir (329). Hücrelerin tek katmandan (monolayer) oluşan hücre konflüansı TEER ölçümü ile değerlendirilebilir. Hücrelerarası boşluklar kapandıkça TEER ölçümünde kademeli bir artış meydana gelirken hücrelerin bariyer özellikleri harabiyete uğradığında, TEER değerlerinde azalma meydana gelir (47, 48). DRP gibi bariyer fonksiyonlarının bozulduğu hastalıklarda TEER değeri azaldığından, *in vitro* DRP hastalık modelinin başarılı bir şekilde gelişimi TEER değerlerindeki azalma ile karakterize edilir (346).

Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin etkinliği, DRP hastalık modeli geliştirilmiş hücre hatlarında, TEER değerleri ve referans maddenin *in vitro* geçişinin incelenmesi ile değerlendirilmiştir (47, 48).

Tez çalışmaları kapsamında, hücre kültüründe DRP hastalık modeli gelişimi aşamasında TEER değerlerinin değişimi izlendiğinde, sadece besiyeri ile muamele edilen hücre hattında zaman içinde TEER değerlerinde bir azalma izlenmezken, VEGF içeren besiyeri ile muamele edilen hücre hattında, TEER değerlerinde anlamlı oranda azalma izlenmiştir (Bkz. Şekil 4.11). Bu azalma KRB harabiyetine bağlı olarak paraselüler yoldan artmış sıvı ve elektrolit transportuna bağlı olarak gelişmektedir. KRB'nin yapısında, madde iletiminde rol alan pek çok farklı taşıyıcı protein yer alır (45,47,48).

ACZ-CD-NP uygulamasının TEER değerleri üzerine etkisi, DRP oluşturulmayan, DRP oluşturulup tedavi verilmeyen ve diğer tedavi seçenekleri uygulanan grupların TEER değerleri ölçümleri ile karşılaştırılmıştır (Bkz. Şekil 4.13. ve Tablo 4.8.). *In vitro* etkinlik çalışmalarında, toksisite çalışmalarının sonuçları değerlendirilerek toksik olmayan en yüksek doz (250 µg/mL) seçilerek hücre kültürü etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. TEER çalışmaları için, bir insert sağlıklı kontrol grubu olarak seçilmiş, etkin madde ve nanopartikül uygulanacak diğer gruplarda ise DRP hastalık modeli geliştirilmiştir (Bkz. Tablo 3.2.). DRP geliştirilmemiş kontrol grubu insertlerindeki hücrelerden elde edilen TEER değerleri belirli bir azalma göstermekle birlikte stabil kalmaya devam ederken, VEGF içeren besiyeri ile inkübe edilen insertlerde bulunan hücrelerin TEER değerinde zamana bağlı olarak bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. 24. saatten sonra tedavi uygulanmayan DRP grubunda TEER değerlerinin çalışmanın sonuna kadar düşük düzeylerde olduğu izlenmiştir. Bu sonuç tedavi edilmeyen DRP modelinde TEER değerlerindeki düzeyi göstermektedir. Boş CD nanopartikül grubunda elde edilen TEER değerleri de DRP hastalık modelini temsil eden gruptaki ile benzer olarak düşük seviyelerde ölçülmüştür. Bu ölçümler, etkin madde yüklü olmayan boş CD nanopartiküllerinin tedavi edici herhangi bir etkisinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Serbest ACZ eklenen insertlerdeki hücrelerin TEER değerleri başlangıçta VEGF varlığına bağlı olarak azalma gösterirken, ortama ACZ eklenmesi

ile belirgin bir artış göstermiştir. ACZ-CD-NP'lerin eklendiği insertlerde de TEER değerlerinde DRP gelişimi ile izlenen düşüşün ardından, nanopartiküllerin ortama eklenmesi ile TEER değerlerinin artarak normal değerlere yaklaştığı izlenmektedir. Serbest ACZ uygulanan grupta TEER değerlerinde gözlenen artış, ACZ-CD-NP grubundan daha yüksektir. Bunun sebebi, serbest ACZ hemen etki gösterirken, nanopartiküllere yüklenen ACZ'nin ortama salınmasından sonra etki ederek KRB harabiyetini tedavi edici etki göstermesidir.

DRP hücre kültürü modelinde yüklü ACZ-CD-NP'lerin etkinliğinin incelenmesinde kullanılan diğer bir parametre geçirgenlik ölçümleridir (351). Bu amaçla 70 kDa FITC işaretli dekstran geçirgenliği incelenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen geçirgenlik çalışmalarında farklı gruplardan elde edilen veriler incelendiğinde (Bkz. Tablo 4.9.) HRMEC grubunda, besiyeri ile inkübe edilen hücrelerin geçirgenlik yüzdesi diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu durum hücrelerin insert yüzeyini tamamen kaplamasına bağlı olarak floresan maddenin alt kompartmana geçişinin düşük olduğunu göstermektedir. DRP grubunda, endotel hücrelerinde VEGF'in sebep olduğu harabiyete bağlı olarak, hücrelerin geçirgenliğinde artış gözlenmiştir. VEGF-ACZ ve VEGF-ACZ-CD-NP gruplarında, DRP hastalık modeli oluşturulduktan sonra ortama serbest ACZ ve ACZ-CD-NP'nin eklenmesi 70 kDa FITC işaretli dekstran geçirgenliğinin önemli ölçüde azalmasına ve geçirgenlik düzeyinin kontrol grubuna yaklaşmasına neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.14.). Boş CD-NP'nin eklenmesinden sonra, VEGF grubunun geçirgenlik değerine benzer bir geçirgenlik değeri tayin edilmiştir. Bu durum boş CD-NP'in hücre proliferasyonu ve onarımında bir etkisinin olmamasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, DRP Hastalık modelinin geliştirilmesi, geçirgenliği anlamlı oranda arttırırken, ACZ-CD-NP uygulaması, bu artmış geçirgenliği azaltarak, sağlıklı kontrol grubundaki (HRMEC) normal seviyeye yaklaştırmaktadır.

Jeong ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada (352), yeni ve seçici bir VEGF reseptörü inhibitörü olan apatinib yüklü polimerik nanopartiküllerin VEGF aracılı retinal vasküler geçirgenliği ve diyabete bağlı retinal vasküler sızıntıyı önleyip önlemediği araştırılmıştır. Çalışmada, nanopartiküllerin HRMEC'lerde VEGF'nin neden olduğu geçirgenlik üzerindeki inhibitör etkisi değerlendirilmiştir. Hücreler

VEGF içeren besiyeri ile inkübe edildikten sonra nanopartiküllere maruz bırakılmış ve zamana bağlı geçirgenlik değişimi ölçülmüştür. Sitotoksik olmayan bir konsantrasyonda (apatinib 1 µM) nanopartiküllerin VEGF ile indüklenen endotelial geçirgenliği tamamen inhibe ettiği görülmüştür Jeong ve ark.'nın çalışması ile sunulan tez çalışmasından da elde edilen sonuçlar VEGF'in güçlü bir geçirgenlik faktörü olduğunu, ancak anti-VEGF bir etkin maddenin ya da bunun kontrollü salım formunun bulunmasının geçirgenliği azalttığını göstermektedir.

Sonuç olarak tez kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar sonucunda, ACZ-CD- NP'lerin HRMEC hücre hattında toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. ACZ-CD-NP'lerin TEER ve geçirgenlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar, DRP'ye bağlı olarak gelişen KRB harabiyetinde ve vasküler geçirgenlik artışında da anlamlı derecede tedavi edici etki gösterdiği izlenmiştir.

5.4.2. *In vivo* Etkinlik Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, ACZ-CD-NP'lerin *in vivo* etkinlik çalışmaları kapsamında tavşan gözlerinde DRP modeli oluşturulmuştur. DRP hastalık modelinde intravitreal uygulanan ACZ-CD-NP'lerin tedavi etkinliği, hiç tedavi verilmeyen DRP grubu ve tedavi verilen gruplarda izlenen tedavi etkinliği ile karşılaştırılmıştır. Tedavi etkinliği, fundus muayene bulguları, FFA incelemeleri, OKT değerlendirmeleri ve FFFM ölçümlerinin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

• Fundus Muayenesi ve Renkli Fundus Fotoğrafları

Fundus muayenesine DRP'nin tedaviye cevabının belirlenmesi için, yeni damar oluşumunun gerileme paternine göre DRP'nin derecelendirmesi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.21.) (145). Grupların çalışma süresince 4 ölçümden elde edilen muayene bulguları, bu dereceleme sistemine göre derecelendirilerek istatistiksel olarak incelenmiş, grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır.

Sağlıklı kontrol grubunda (Grup 1) çalışma süresi boyunca yapılan tüm muayenelerde, retina, maküla, optik sinir ve damar yapıları doğal olarak izlenmiştir

(Bkz. Şekil 4.20.A-D). Grup 2'nin zaman içinde DRP muayene verileri incelendiğinde, 2. Ölçüm zamanında oluşturulmuş olan DRP bulgularının çalışmanın sonuna kadar devam ettiği gözlenmiştir (Tablo 4.13.). Grup 3'ün de çalışma boyunca yapılan ölçüm zamanlarındaki DRP muayene verileri incelendiğinde, benzer şekilde hem 3. ölçüm zamanında hem de 4. ölçüm zamanında DRP bulgularının artarak devam ettiği izlenmektedir. (Tablo 4.13.) Grup 4'ün DRP bulgularının zamana bağlı değişimi incelendiğinde, tedavi sonrası 1. haftada DRP bulgularında bir miktar iyileşme izlenmekle birlikte bu iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı, ve tedavi sonrası 1. ayda yapılan muayenelerde DRP bulgularının eski şiddetine döndüğü izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.20., Şekil 4.22., ve Tablo 4.13.). Grup 5'in DRP bulgularının çalışma boyunca değerlendirmeleri incelendiğinde, 3. Ölçüm zamanında DRP bulgularında Grup 6'yla benzer oranda iyileşme izlendiği, 4. Ölçüm zamanında ise DRP bulgularının tamamen iyileştiği gözlenmiştir (ö2 ile ö4 için $p=0.020$). Bu sonuçlar, ACZ-CD-NP tedavisinin, DRP bulgularında tedaviden sonra 1. hafta başlayan ve 1 ay süren tedavi edici etkisini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.21. ve Tablo 4.13.). Grup 6'nın DRP bulgularının seyri incelendiğinde, hem 3. Ölçüm zamanında hem de 4. Ölçüm zamanında DRP bulgularında anlamlı düzeyde iyileşme olduğu gözlenmiştir (ö2 - ö4 ve ö2- ö3 için $p=0.028$) (Bkz. Şekil 4.22. ve Tablo 4.13.).

Tedaviden sonraki 1. hafta muayenelerinde hem serbest ACZ verilen tavşanlarda (Grup 4) hem de ACZ-CD-NP uygulanan tavşanlarda (Grup 5) DRP bulgularında iyileşme izlenmiştir. Bu gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında ACZ-CD-NP uygulanan tavşanlarda izlenen iyileşmenin, bevasizumab verilen tavşanlarla (Grup 6) benzer düzeyde olduğu görülmektedir. Bu iki grup arasında tedavi sonrası 1. haftada yapılan muayenelerde DRP derecesi arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Öte yandan serbest ACZ verilen grupta elde edilen iyileşme, bevasizumab verilen tavşanlarda (Grup 6) elde edilen iyileşmeden anlamlı oranda düşüktür (Grup 4 ile Grup 6 için $p=0,023$). Bu sonuçlar, serbest ACZ tedavisi ile elde edilen cevabın bevasizumab grubundan anlamlı olarak düşük olduğunu göstermektedir. Şekil 4.22. incelendiğinde de ACZ ile tedavi edilen grubun tedaviye cevabının ACZ-CD-NP ile tedavi edilen gruptan elde edilen cevaba oranla daha düşük olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.13.). Bu durum serbest asetazolamidin

vitreusta kısa sürede eliminasyona uğramasından kaynaklanmaktadır. ACZ-CD-NP grubunda ise sürekli asetazolamid salımı olduğundan, vitreusta asetazolamid bulunmaktadır.

- **Optik Koherens Tomografi**

Tez çalışması kapsamında geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin retinal ödem üzerindeki etkileri OKT incelemelerindeki retina kalınlık değişimleri ile takip edilmiştir (Bkz Tablo 4.14. ve Şekil 4.24.) OKT ölçümleri, maküлада diyabete bağlı gelişen patolojilerin tanı ve takibinde kullanılan altın standart görüntüleme yöntemidir. Maküla, insan dışında sadece maymunlarda tanımlanmış özelleşmiş bir retina alanıdır. DRP çalışmalarında en sık kullanılan denek türleri olan tavşan veya sıçan gözlerinde insandakine benzer, maküla olarak adlandırılabilen bir özel bölge mevcut değildir. Tavşan gözlerinde, makülaya benzer özellik gösteren area santralis bölgesi mevcuttur. İdeal bir maküler ödem hastalık modeli de mevcut değildir. Bununla birlikte tavşanlarda ve sıçanlarda, retinal damarlarda artmış vasküler geçirgenliğe bağlı olarak retina tabakalarında kalınlık artışı gösterilmiştir (291). Bu kalınlık artışının tedavi ile azalması, yeni geliştirilen ilaçların ve ilaç taşıyıcı sistemlerin diyabetik maküler ödem tedavisindeki etkinliğinin incelenmesinde kullanılmasına imkan sağlamaktadır (353, 354).

VEGF uygulaması, tavşan gözlerinde vasküler geçirgenliği artırarak retina dokusuna sıvı sızıntısına sebep olur. Vasküler dokudan sızan sıvı retina tabakalarında birikerek retina kalınlığının artmasına sebep olur. Aranda ve ark. (291), tavşan gözlerine intravitreal VEGF uygulamasının, retina kalınlığında anlamlı kalınlık artışına sebep olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, bu yöntemin retinal ödem ve angiogenesis ile seyreden retinal hastalıkların tedavisine yönelik geliştirilen yeni ilaçların etkinliklerinin incelenmesinde kullanışlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Qui ve ark. (354), sıçanlarda DRP modelinde vasküler geçirgenlik artışına bağlı olarak retinal ödemin geliştiğini ve OKT ölçümlerinde retina kalınlıklarında artış olduğunu göstermiştir. Çalışma kapsamında geliştirilen fenofibrat nanopartiküllerin intravitreal uygulanması sonucunda, DRP bulgularında iyileşme ve retinal ödem de gerilemeye bağlı olarak da OKT ölçümlerinde retina kalınlıkları azalarak, kontrol zamanındaki ölçüme yaklaşmıştır. Ayrıca, fenofibrat nanopartiküllerinin sıçanlara intravitreal

uygulanmasından sonra yapılan vasküler geçirgenlik ölçümlerinde de retina kalınlıklarına benzer şekilde azalma izlenmiştir. Araştırmacılar OKT ölçümlerinde ve geçirgenlik testlerine izlenen bu azalmanın, nanopartiküler fenofibrat tedavisinin DRP tedavisindeki etkinliğinin göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Zeng ve ark. (353), DRP geliştirilmiş sıçanlarda, interlökin 12 (IL-12) yüklü PLGA nanopartiküllerinin intravitreal uygulaması ile retinal neovaskülarizasyonda iyileşme ve retina kalınlığında azalma olduğunu göstermişlerdir. Yazarlar nanopartiküler sistemin, IL-12'yi vitreustaki proteazların etkilerinden koruyarak intravitreal IL-12 seviyesinin daha uzun süre korunmasını sağladığını bildirmişleridir.

Tez çalışmaları kapsamında, intravitreal uygulanan ACZ-CD-NP'lerin retinal ödem tedavisindeki etkinliğini incelemek amacıyla, çalışma gruplarında sağlıklı kontrollerde, DRP hastalık modeli oluşturulduğunda ve tedavi sonrası 1. hafta ve 1. ay kontrollerinde OKT ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen OKT ölçüm sonuçları grup içi ve gruplar arası karşılaştırmalarla istatistiksel olarak incelenmiştir (Bkz Tablo 4.14., Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.) Sağlıklı kontrol grubunda (Grup 1), çalışma süresince yapılan 4 ölçümde de OKT değerlerine anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Bkz. Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.). Tedavi uygulanmayan DRP hastalık grubunda (Grup 2), 1. hafta ve 1 ayda elde edilen sonuçlarla, aynı grubun ilk muayenelerinde (1.ölçüm) elde edilen değerler arasında anlamlı oranda fark izlenirken, hastalık modeli geliştirildikten sonra (2. ölçümle) elde edilen bulgular arasında fark arasında anlamlı fark izlenmemiştir. PBS uygulanan grupta (Grup 3) da benzer şekilde, 1.hafta ve 1 ayda elde edilen retina kalınlık ölçümleriyle, ilk muayenede ölçülen retina kalınlıkları arasında anlamlı fark izlenirken, DRP oluşturulduktan sonra ölçülen kalınlıklar arasında anlamlı fark izlenmiştir. Bu sonuçlar tedavi uygulanmayan her iki grupta da DRP hastalık bulgularının sebep olduğu retina kalınlık artışının, çalışmanın sonuna kadar yapılan tüm muayenelerde devam ettiğini göstermektedir (Bkz. Tablo 4.14., Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.). ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grubun (Grup 5) tedavi sonrası 1. haftada ölçülen retina kalınlıkları, DRP hastalık modeli geliştirildiğinde ölçülen retina kalınlıklarına oranla anlamlı olarak azalmışken, ilk ölçümde elde edilen retina kalınlıkları ile fark göstermemektedir. Tedaviden sonra 1. ayda yapılan muayenelerde de retina kalınlık ölçümleri, sağlıklı kontrol muayenelerindeki

ölçümlerle benzer iken, DRP izlenen dönemdeki ölçümlerle anlamlı fark göstermektedir. Bu sonuçlar, ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grupta DRP'ye bağlı olarak retinada gelişen kalınlık artışının tedavi sonrası 1.haftada normal düzeyine döndüğünü ve 1 ay boyunca normal düzeyde devam ettiğini göstermektedir. Bu durum ACZ-CD-NP uygulamasının DRP'ye bağlı retina kalınlık artışı üzerinde anlamlı bir tedavi etkisi elde edildiğini göstermektedir (Bkz. Tablo 4.14., Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.). Bevasizumab ile tedavi edilen grubun (Grup 6), hem 1. haftada hem de 1. ayda ölçülen retina kalınlıkları DRP hastalık dönemindeki kalınlıklardan farklı olup sağlıklı kontrol muayenesindeki ölçümle benzerdir. Bu sonuçlar, bevasizumabın DRP'ye bağlı retina kalınlık artışı üzerinde, ilk hafta başlayıp bir ay süresince devam eden tedavi edici etkisi olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.14. ve Şekil 4.24.). Serbest asetazolamid ile tedavi edilen grubun (Grup 4) 1. hafta ve 1. ayda ölçülen retina kalınlık ölçümleri, aynı grubun sağlıklı kontrol ölçümleriyle farklılık gösterirken, DRP hastalık modeli olduğu andaki bulgularıyla fark göstermemektedir. Şekil 4.24.'de sunulduğu gibi, bu grubun 1. hafta ölçümlerinde retina kalınlığının bir miktar azaldığı daha sonra 1. ay ölçümünde tekrar arttığı gözlenmiştir. 1.hafta izlenen azalma sağlıklı kontrol veya DRP hastalık modeli zamanlarında alınan ölçümle istatistiksel bir fark oluşturmamıştır. Bu azalmanın 1. ay ölçümünde devam etmediği tespit edilmiştir.

ACZ-CD-NP uygulamasının tedavi etkinliğinin incelenmesi için, gruplararası karşılaştırmalar da yapılmıştır. ACZ-CD-NP uygulamasının, retina kalınlığı üzerindeki tedavi edici etkisinin diğer gruplarla karşılaştırılması amacıyla ACZ-CD-NP uygulanan grubun 1. haftada ve 1. ayda ölçülen OKT kalınlıkları, sağlıklı kontrol grubunun ve DRP oluşturulup tedavi uygulanmayan grupların (Grup 2 ve Grup 3), aynı ölçüm zamanlarında tayin edilen retina kalınlıkları ile karşılaştırılmıştır. ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grubun 1.hafta ve 1.ay ölçümlerindeki retina kalınlıkları ile sağlıklı kontrol grubunun (Grup 1) aynı ölçüm zamanları arasında anlamlı fark bulunamazken ($p=0,473$), DRP hastalık grubunun retina kalınlık ölçümleriyle karşılaştırıldığında hem 1. hafta ölçümlerinde ($p=0,006$) hem de 1. ay ölçümlerinde ($p=0,001$) anlamlı fark olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, ACZ-CD-NP uygulanan grupla, PBS uygulanan grubun retina kalınlık ölçümleri arasında da hem 1. haftadaki sonuçlar ($p=0,012$) hem de 1. aydaki sonuçlar ($p<0,001$) arasında anlamlı fark

izlenmiştir (Bkz. Tablo 4.14. ve Şekil 4.24.). Bu sonuçlar ACZ-CD-NP'lerin retina kalınlık artışı üzerindeki tedavi edici etkisini göstermektedir.

ACZ-CD-NP uygulamasının tedavi etkinliğinin diğer iki tedavi seçeneği olan serbest ACZ ve bevasizumab uygulamalarıyla (Grup 4 ve Grup 6) karşılaştırmak amacıyla da gruplar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grupta bevasizumabla tedavi edilen grup arasında hem 1. haftada elde edilen sonuçlar arasında ($p=0,065$) hem de 1. ayda elde edilen sonuçlar arasında ($p=0,282$) anlamlı fark olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, DRP hastalık modelinde intravitreal uygulanan ACZ-CD-NP'lerin, halen standart tedavi seçeneği olan bevasizumaba eşit düzeyde tedavi edici etki gösterdiğini ifade etmektedir. (Bkz. Tablo 4.14., Tablo 4.15. ve Şekil 4.24.). ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grup ile serbest ACZ ile tedavi edilen grup arasında 1. hafta ölçülen retina kalınlıkları arasında anlamlı fark olmadığı ($p=0,468$), ancak 1. ay muayenelerinde anlamlı fark olduğu gözlemlenmiştir ($p=0,001$). Bu sonuçlar, serbest ACZ tedavisinin erken dönemde bir miktar etki göstermekle birlikte bu etkinin kısa süreli olduğunu ve 1 ay sürmediğini göstermektedir.

- **Fundus Fluoresein Anjiyografi**

DRP grubundaki tavşanların çalışma süresince fundus fluoresein anjiyografi (FFA) bulguları incelendiğinde, 1. hafta ve 1. aylarda alınan FFA görüntülerinde, retinal damarlardan fluoresein sızıntısının artarak devam ettiği gözlenmiştir. PBS uygulanan grupta da DRP grubuna benzer sonuç elde edilmiştir. Serbest ACZ uygulanan grubun FFA bulgularının zamana bağlı değişimi incelendiğinde, 1. haftada çekilen FFA görüntülerinde fluoresein sızıntısında bir miktar azalma izlenmekle birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Bu grupta 1. ayda yapılan FFA incelemelerinde, fluoresein sızıntısının, yine anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.18. ve Şekil 4.26.). ACZ-CD-NP uygulanan tavşanlarda yapılan FFA incelemelerinde, 1. haftada FFA'da izlenen fluoresein sızıntısının anlamlı olarak azaldığı ve 1. ayda da FFA bulgularındaki azalmanın devam ettiği tespit edilmiştir (ö2 ile ö4 için $p=0,020$). Bevasizumab uygulanan grupta hem 1. hafta hem de 1. ay muayenelerindeki FFA bulgularında azalma gözlemlenmekle birlikte sadece

1. aydaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu görülmüştür (ö2 ile ö3 için $p=0,020$) (Bkz. Tablo 4.18.). 1.haftada ACZ-CD-NP uygulanan tavşanlardan ve bevasizumab uygulanan tavşanlardan elde edilen FFA incelemelerinde izlenen sızıntıdaki azalma düzeyleri arasında fark yoktur. Bu sonuç ACZ-CD-NP ile tedavi edilen grubun tedaviye cevabının bevasizumab ile tedavi edilen grupla aynı düzeyde olduğunu göstermektedir. 1.ayda elde edilen sonuçlar için de benzer durum geçerlidir. Öte yandan serbest ACZ ile tedavi edilen grubun 1. haftada yapılan FFA incelemelerinde, retinal damarlardan izlenen sızıntı miktarı hem ACZ-CD-NP uygulanan gruba hem de bevasizumab uygulanan gruba oranla anlamlı derecede fazladır ($p=0,020$). Bu sonuç, serbest ACZ tedavisi ile elde edilen cevabın hem ACZ-CD-NP grubundan hem de bevasizumab grubundan anlamlı olarak düşük olduğunu göstermektedir (Bkz. Tablo 4.18. ve Şekil 4.26.).

• Fundus Fluorofotometri İncelemeleri

Çalışma kapsamında, grupların ölçüm zamanlarında elde edilen FFFM ölçüm sonuçları incelendiğinde, DRP hastalık grubunda, geçirgenlik değeri DRP hastalık modeli oluşturulmasıyla birlikte ortalama 4 kat artmış ve çalışmanın sonuna kadar yüksek değerlerde seyretmiştir. Çalışma süresince yapılan 1. hafta ve 1. ay ölçümlerinde de geçirgenlik değerlerinin, hastalık modeli oluşturulan ölçümdeki değerine yakın seviyelerde izlendiği görülmüştür. PBS grubunun geçirgenlik değerleri de 2., 3. ve 4. ölçümlerde sağlıklı grubun ölçüm zamanındaki değerden yüksek düzeylerde seyretmiştir. Tedavi uygulanmayan bu iki grupta, geçirgenlik değerinin DRP hastalık oluşturulduğu andan itibaren azalma göstermeden yüksek değerlerde ölçüldüğü gözlemlenmektedir (Bkz. Tablo 4.19. ve Şekil 4.27.). Serbest ACZ grubunda geçirgenlik değerlerinde DRP hastalık modeli oluşturulmasıyla bir yükselme izlenmiştir. 1. hafta ölçümlerinde, geçirgenlik ölçümlerinde bir miktar azalma göstermekle birlikte 1. ay ölçümlerinde tekrar artmıştır. ACZ-CD-NP uygulanan grupta, DRP hastalık modeli ile geçirgenlik değerinde artış izlenmiş, tedavi sonrası bu değer azalarak, normal sağlıklı kontrol zamanında ölçülen değerler düzeyine düşmüştür. 1. ay ölçümlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar ACZ-CD-NP uygulamasının, KRB harabiyetindeki tedavi edici etkisine bağlı olarak retinal damarların geçirgenliğindeki azalmayı göstermektedir. Bevasizumab uygulanan

grupta da hem 1. hafta hem de 1. ay ölçümlerinde, geçirgenlik değerlerinin hastalık zamanındaki değerlere oranla azaldığı bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.27.). Geçirgenlik değerleri incelendiğinde hastalık modeli oluşumundan sonra değerlerin arttığı, tedavi verilmeyen grupta bu artışın devam ettiği, tedavi verilen gruplarda ise azaldığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.27.). Gruplar arasındaki karşılaştırmalarda veya grupların farklı ölçümlerdeki değerlerinin grup içi karşılaştırmalarında, değerler arasında izlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.20.).

In vitro ve *in vivo* çalışmaların sonuçları yorumlandığında, serbest asetazolamidin hem DRP hastalık modeli geliştirilmiş hücre kültüründe hem de tavşan gözlerinde KRB ve vasküler geçirgenlik üzerinde anlamlı etkisi olduğu görülmüştür. *In vivo* çalışmaların 1. hafta ve 1. ay sonuçları karşılaştırıldığında asetazolamidin etkisinin kısa süreli olduğu tespit edilmiştir. ACZ-CD-NP'lerin hem *in vitro* hem *in vivo* DRP modelinde anlamlı düzeyde tedavi edici etki gösterdiği bulunmuştur. ACZ-CD-NP'lerin *in vivo* etkinliğinin hem tedavi sonrası 1. hafta hem de 1. ay muayenelerinde izlendiği görülmektedir. ACZ-CD-NP'lerin, *in vivo* DRP modelindeki etkinliğinin, DRP tedavisinde halen en sık kullanılan molekül ile benzer etki gösterdiği tespit edilmiştir.

ACZ çok uzun süredir farklı sebeplere bağlı maküler ödem tedavisinde olgu bazında kullanılmaktadır. Diyabetik maküler ödem tedavisinde ACZ'nin etkinliğini inceleyen bir pilot çalışmada, katılımcılara üç ay boyunca ağızdan ACZ tedavisi uygulanmıştır. Çalışma sonunda, DRP'si olan hastaların ACZ tedavisi sonrası FFA bulgularında ve perimetrik incelemelerinde anlamlı düzeyde iyileşme izlendiği rapor edilmiştir. Ancak görme düzeyindeki artışın anatomik düzelmeye oranla daha az olduğu bildirilmiştir (355). Retinitis pigmentozaya bağlı gelişen maküler ödemin tedavisinde ACZ'nin etkinliğinin incelendiği bir çalışmada, gruplardan birine 2 hafta boyunca 500 mg/gün, diğerine 250 mg/gün dozda oral ACZ tedavisi uygulanmıştır. Çalışma sonunda araştırmacılar, 500 mg/gün ACZ tedavisi verilen grupta tedavi edici etkinin daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, doz artışının hem görme düzeyindeki hem de FFA bulgularındaki artışı direkt etkilediğini bildirirken, bu yüksek dozların uzun süre kullanım açısından risklerine dikkat çekmişlerdir (356).

ACZ'nin retinitis pigmentozaya bağlı gelişen KMÖ tedavisindeki etkinliğini inceleyen bir meta analizde, ACZ tedavisi verilen olgularda, santral maküla kalınlığında anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir (23). Çalışmada ayrıca ACZ kullanımından sonra, iştahsızlık, yorgunluk, hatta böbreklerde taş oluşumu gibi yan etkilerin gözlendiği, bu yan etkilerin ACZ'nin sistemik kullanıldığının bildirildiği çalışmalarda daha sık rapor edildiği bildirilmiştir (161). İnflamatuvar nedenlere bağlı gelişen maküler ödemin tedavisinde sistemik ACZ etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, oral asetazolamid tedavisi sonrası hem görme düzeylerinde anlamlı artış olduğu, hem de santral maküla kalınlıklarında anlamlı derecede azalma olduğu bulunmuştur (174). Çalışmada, ACZ hem görsel hem anatomik baŐarisına dikkat çekilmiŐ ancak sebep olduğu sistemik yan etkiler göz önüne alınarak, sadece diğer tedavilere dirençli veya cevapsız olgularda kullanılması önerilmiŐtir.

ACZ'in, hem KAI etkisine bağlı etkileri hem de KAI grubundaki diğer üyelerinde olmayan bazı etkileri de vardır. Son yıllarda yapılan alıŐmalar ACZ'nin bu özelliklerinin de ödem tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (21,176). ACZ'nin DRP tedavisinde etki mekanizmaları konusundaki literatür bilgileri incelendiğinde ACZ'nin etkilerinin üç farklı mekanizma ile olabileceği görölmektedir. Bu etkiler RPE hücrelerindeki KA enziminin inhibisyonu ve vitreustaki KA enziminin inhibisyonu (bu mekanizma muhtemelen KKS inhibisyonu aracılığıyla etki göstermektedir), retina hücre tabakalarındaki akuaporinlerin inhibisyonu ve retinal vasküler yapılar üzerindeki etkileri aracılığıyla oluşmaktadır.

RPE

ACZ'nin ödem tedavisindeki en bilinen etkisi RPE'deki KA'lar üzerindeki inhibe edici etkisidir. Bu etki pek çok ve klinik öncesi çalışma ile kanılanmıŐtır (22, 23).

Kallikrein

ACZ'nin son yıllarda bildirilen bir başka etkisi de vitreustaki KA enziminin inhibisyonu ile ilgilidir. Gao ve ark. (21), KA enziminin DRP gelişimi üzerindeki

etkilerini inceledikleri deneysel çalışmalarında, sıçanlarda intravitreal uygulanan KA enziminin vasküler geçirgenlik artışı ve DRP hastalık modeli gelişimine yol açtığını göstermişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada KA enjeksiyonunun yanında gruplara asetazolamid ve başka KKS inhibitörleri de uygulandığında, KA'nın ACZ ile birlikte uygulandığı grupta ve KA'nın diğer KKS inhibitörleriyle birlikte uygulandığı grupta vasküler geçirgenlik artışı ve DRP bulgularının gelişmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ACZ'nin etkisinin vitreus pH'sının alkali hale gelmesini sağlayarak KKS'inin inhibisyonundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Tez çalışmasında ACZ'nin hem retinal neovaskülarizasyonu hem de retinal ödemi güçlü bir şekilde baskılmasında KSS üzerindeki etkilerinde katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Akuaporinler

ACZ'in maküler ödem konusundaki tedavi edici etkisinde rol alan diğer önemli bir mekanizmanın, AQP kanalları üzerindeki etkisinin olduğunu düşünülmektedir. AQP kanalları, tüm nöral dokuda olduğu gibi retina dokusunda da sıvı-elektrolit dengesinin sağlanmasında ve sürdürülmesinde çok önemli role sahiptir (105, 357). Diyabet ve diğer pek çok iskemik hastalığa bağlı olarak, retinadaki AQP1 ve AQP4 kanallarının ifadesinin, dağılımının ve fonksiyonlarının değişmesinin maküler ödem gelişimindeki etkisi gösterilmiştir (108, 357). Vujošević ve ark.'nın çalışmasında (357), diyabetik hastalarda, sağlıklı bireylere oranla aköz sıvılarında, AQP1 ve AQP4 düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada retinopatisi olan diyabetik hastalarda AQP1 ve AQP4 düzeylerinin, retinopatisi olmayan diyabetik hastalara oranla da anlamlı yüksek olduğu bildirilmiştir. Kida ve ark. çalışmasında (88), DRP geliştirilmiş sıçanlarda, artmış VEGF seviyesinin Müller hücrelerinde AQP4 düzeyini değiştirerek ödeme sebep olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, seçici AQP4 inhibitör etkili ajanların, VEGF aracılı AQP4 artışını bloke ederek, maküler ödemde tedavi edici etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Hipergliseminin endotel hücrelerinde AQP 1 düzeyini arttırarak, proinlamatuar proteinlerin düzeyini arttırdığı ve nitrik oksit (NO) düzeyini azalttığı gösterilmiştir (358). Madonna ve ark.'nın çalışmasında (359), hipergliseminin tetiklediği AQP1

aracılı bu değişikliklerin, diyabetik sıçanlarda vasküler geçirgenliğin yanı sıra angiogenezi ve proliferatif DRP tablosunu da uyardığı gösterilmiştir.

ACZ'nin AQP4 kanalları üzerindeki etkisi, retinal ödem tedavisindeki etkinliğine de katkıda bulunmuş olabilir.

Diğer

ACZ'nin bu etkilerinin yanında, retinal damar sistemi üzerinde de etkileri vardır. Bu etkilerine bağlı olarak, retina kan akışı ve oksijen tansiyonu üzerinde düzenleyici rolü olduğu savunulmaktadır (360-362). Reber ve ark. (360), KAI etkinin, hücreiçi ve hücreler arası ortamda pH değişikliğine sebep olarak, kapiller çapın artmasına sebep olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar bu artışın perisitleri etkileyerek, retinal kan akımını arttırabileceğini savunmuşlardır. ACZ'nin kalsiyum tarafından aktive edilen potasyum kanallarını aktive ederek retinal damar duvarındaki düz kasları uyardığı ve retinal damarlarda vasodilatasyona sebep olduğu gösterilmiştir (361). Kalsiyum tarafından aktive edilen potasyum kanalları, KAI etkili ilaçların diğerlerinde olmayan sadece ACZ'ye özgün bir etkisidir. ACZ tedavisinin, retina damarları üzerindeki bu etkilerinin, retinal perfüzyonu arttırarak, retinal kan akımının bozulduğu durumlarda tedavi edici etkiye katkı sağlayabileceğini savunulmuştur (362). ACZ tedavisinin DRP'deki tedavi edici etkisinde bu mekanizmaların da rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

ACZ düşük çözünürlüğe sahip, yarılanma ömrü çok kısa olan bir ilaçtır. ACZ'nin düşük biyoyararlanımı, onun sistemik uygulamalarını zorunlu kılmaktadır. Sistemik dolaşımda karşılaşılan yan etkiler, bu uygulamaların ancak kısa süreyle yapılabilmesine imkan vermektedir. Bu nedenlerle ACZ, göz hastalıklarının tedavisinde sadece ameliyat öncesi veya acil durumlarda, kısa süreli olarak oral olarak uygulanmaktadır (17).

Lu ve ark.'nın çalışmasında (363), intravitreal nanopartiküler bevasizumab tedavisinin diyabetik sıçanlarda VEGF baskılayıcı etkisinin, intravitreal serbest bevasizumab uygulanan gruba oranla belirgin ölçüde uzadığını bildirmişleridir.

Araştırmacılar, etkinliği gösterilmiş nanopartiküler sistemlerinin geliştirilerek vitreustaki etki süresinin başarı ile uzatılabileceğini bildirmişlerdir.

Nanopartikler ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddelerini znrlk problemlerinin zlmesinde, vücuttaki bariyerlerin aşılmasında, kontrollü salım sağlanmasında etkili zmler getirmektedir. İntravitreal nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, etkinliği yüksek amaç zznrlğ ve yarılanma ömrü düşük ilaçların uygulanmasına fırsat verme, kontrollü salım sağlayarak intravitreal enjeksiyon sıklığını azaltma ve retina dokusuna geçişi arttırarak tedavi cevabını arttırma gibi stnlkler sağlamaktadır.

Tezalışmaları kapsamında göz hastalıklarında başka tanılarlaok uzun süredir kullanılmakta olan ACZ etkin maddesi ve yine gzdeok uzun süredir kullanılmakta olan siklodekstrin kullanılmıştır. Geliştirilen ACZ yüklü siklodekstrin nanopartiküllerin, intravitreal uygulamalar için uygun olduğu gözlemlenmiştir. *İn vitro* ve *in vivo* uygulamalarda, göz dokularında toksik ve alerjik bir etkiye sebep olmadığı izlenmiştir. İn vitro ve in vivo uygulamalarda DRP hastalık bulgularını anlamlı oranda tedavi ettiği gözlemlenmiştir. ACZ yüklü CD nanopartikül tedavisinde elde edilen sonuçlar, serbest ACZ ile elde edilen tedavi cevabından anlamlı olarak yüksektir. Öte yandan ACZ yüklü siklodekstrin tedavisinde elde edilen sonuçlar, halen DRP’de en sık tercih edilen farmakolojik ajan olan bevasizumab’la aynı düzeydedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde:

- Ön formülasyon çalışmalarında iki farklı polimer (PHBV ve CD) kullanılarak nanopartiküller hazırlanmış, ve Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan CD nanopartiküllerinin intravitreal uygulama için talep edilen kriterleri sağladığı tespit edilmiştir.

- Yöntem 1 kullanılarak hazırlanan ACZ yüklü CD nanopartiküllerin (ACZ-CD-NP) karakterizasyon çalışmalarında:

- Siklodekstrin, ACZ ve ACZ-CD-NP'lerin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması sonucu karakteristik piklerde görülen çakışma nanopartiküllere asetazolamidin yüklendiğini göstermiştir,
- DSL analizlerinde, ortalama partikül büyüklüğü 238 nm, zeta potansiyeli -16,8 mV ve PDI değeri 0,16 olarak bulunmuştur,
- SEM görüntülerinde CD nanopartiküllerin düzgün ve küresel formda ve boyutlarının ortalama 130-170 nm olduğu belirlenmiştir,
- Türbidimetre cihazı ile tayin edilen ACZ-CD-NP'lerin degradasyon hızı çalışmalarında sıcaklık arttıkça degradasyon oranının arttığı bulunmuştur. Ayrıca formülasyonda ACZ etkin maddesinin varlığı daha stabil bir degradasyon oluşmasını sağlamıştır,
- ACZ yüklü nanopartiküllerin *in vitro* salım profilinde, ilk patlama (burst) salımının ardından yavaş ve kontrollü bir şekilde salımın devam ettiği görülmüştür.

- DRP hastalık modeli geliştirilmiş HRMEC hücre hattına ACZ-CD-NP'lerin *in vitro* sitotoksisite ve etkinliklerinin incelenmesi çalışmalarında:

- ACZ-CD-NP uygulaması ile TEER değerlerinin artarak sağlıklı kontrol grubundaki normal değerlere yaklaştığı gözlemlenmiştir,

- ACZ-CD-NP uygulaması ile geçirgenliğin azalarak sağlıklı kontrol grubundaki normal seviyeye yaklaştığı gözlemlenmiştir,
- MTT testinde asetazolamid konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksitesinin de arttığı izlenmiştir. 250 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığının yaklaşık %90 olduğu bulunmuştur.
- DRP hastalık modeli geliştirilmiş tavşanlarda ACZ-CD-NP'lerin *in vivo* etkinlik ve toksisitelerinin incelenmesi çalışmalarında:
 - İntravitreal ACZ-CD-NP uygulamasından sonra 1. hafta ve 1. ay muayenelerinde hiç bir tavşanda ön segmentte veya arka segmentte inflamasyonla veya endoftalmi ile ilişkili bulgu izlenmemiştir. Tedavi sonrası yapılan muayenelerde göz içi basıncı ölçümlerinin normal sınırlarda olduğu, anlamlı bir değişim gelişmediği izlenmiştir,
 - DRP hastalık modeli geliştirilmiş ve intravitreal ACZ-CD-NP uygulanmış tavşanlarda takip süresince yapılan fundus muayenelerinde, DRP bulgularında tedavi sonrası 1. haftada başlayan ve 1 ay süren tedavi edici etki gözlemlenmiştir,
 - DRP hastalık modeli geliştirilmiş ve intravitreal ACZ-CD-NP uygulanmış tavşanlarda takip süresince yapılan OKT incelemelerinde, DRP'ye bağlı olarak retinada gelişen kalınlık artışının tedavi sonrası 1. haftada normal düzeyine döndüğü ve 1 ay boyunca normal düzeyde devam ettiğini gözlemlenmiştir,
 - DRP hastalık modeli geliştirilmiş ve intravitreal ACZ-CD-NP uygulanmış tavşanlarda takip süresince yapılan FFA incelemelerinde, 1. haftada FFA'da izlenen fluoresein sızıntısının anlamlı olarak azaldığı ve 1. ayda da FFA bulgularındaki azalmanın devam ettiği tespit edilmiştir.
 - DRP hastalık modeli geliştirilmiş ve intravitreal ACZ-CD-NP uygulanmış tavşanlarda takip süresince yapılan FFM incelemelerinde, DRP hastalık modeline bağlı olarak gelişmiş olan geçirgenlik değeri

azalarak, normal sağlıklı kontrol zamanında ölçülen değerler düzeyine düşmüştür. 1. ay ölçümlerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak tez çalışmaları kapsamında geliştirmiş olan CZ-CD-NP'lerin DRP tedavisindeki etkinliği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir. Daha sonra yapılacak *in vivo* çalışmalarda intravitreal uygulanan ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip ACZ-CD-NP'lerin sağlıklı ve DRP geliştirilmiş tavşanların göz dokularındaki dağılımı incelenerek karşılaştırılabilir. Ayrıca geliştirilen ACZ-CD-NP'lerin topikal ve subtenon uygulama sonrası vitreusa geçiş düzeyleri incelenebilir.

7. KAYNAKÇA

- 1 Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R. Meta-Analysis for Eye Disease Study Group. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2012; 35:556-564.
- 2 Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L, ve ark. Ranibizumab for diabetic macular edema: Results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*. 2012;119:789-801.
- 3 Mitchell P, Bandello F, Schmidt-Erfurth U, Lang GE, Massin P, Schlingemann RO. The RESTORE study: Ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):615–25.
- 4 Virgili G, Parravano M, Evans JR, Gordon I, Lucenteforte E. Anti-vascular endothelial growth factor for diabetic macular oedema: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;10(10):1-145.
- 5 Shikari H, Silva PS, Sun JK. Complications of intravitreal injections in patients with diabetes. *Semin Ophthalmol*. 2014;29(5-6):276-89.
- 6 Del Amo EM, Rimpelä AK, Heikkinen E, Kari OK, Ramsay E, Lajunen T, ve ark. Pharmacokinetic aspects of retinal drug delivery. *Prog Retin Eye Res*. 2017;57:134-185.
- 7 Short BG. Safety evaluation of ocular drug delivery formulations: techniques and practical considerations. *Toxicol Pathol*. 2008;36(1):49-62.
- 8 Ranta VP, Mannermaa E, Lummeppuro K, Subrizi A, Laukkanen A, Antopolsky M, ve ark. Barrier analysis of periocular drug delivery to the posterior segment. *J Control Release* 2010;148: 42–48.
- 9 Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular Drug Delivery: Present Innovations and Future Challenges. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019;370(3):602-624.
- 10 Kompella UB, Amrite AC, Pacha Ravi R. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. *Prog Retin Eye Res*. 2013;36:172–198.
- 11 Edelhauser HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:961-964.
- 12 Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Bandello F, Berg K, Chakravarthy U, Gerendas BS ve ark. Loewenstein Guidelines for the Management of Diabetic Macular Edema by the European Society of Retina Specialists. *Ophthalmologica*. 2017;237(4):185-222.
- 13 Meza-Rios A, Navarro-Partida J, Armendariz-Borunda J, Santos A. Therapies Based on Nanoparticles for Eye Drug Delivery. *Ophthalmol Ther*. 2020;9(3):114.

- 14 Bisht R, Mandal A, Jaiswal JK, Rupenthal ID. Nanocarrier mediated retinal drug delivery: overcoming ocular barriers to treat posterior eye diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2018;10(2).
- 15 Bisht R, Rupenthal ID. PLGA nanoparticles for intravitreal peptide delivery: statistical optimization, characterization and toxicity evaluation. *Pharm Dev Technol.* 2018;23(4):324-333.
- 16 Delplace V, Payne S, Shoichet M. Delivery strategies for treatment of age-related ocular diseases: From a biological understanding to biomaterial solutions. *J Control Release.* 2015;219:652-668.
- 17 Kaur IP, Kakkar S. Nanotherapy for posterior eye diseases. *J Control Release.* 2014;193:100-112.
- 18 Farokhzad OC, Langer R. Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS nano.* 2009; 3:16–20.
- 19 Gahlaut N, Suarez S, Uddin MI, Gordon AY, Evans SM, Jayagopal A. Nanoengineering of therapeutics for retinal vascular disease. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;95:323-330.
- 20 Joseph RR, Venkatraman SS. Drug delivery to the eye: what benefits do nanocarriers offer? *Nanomedicine (Lond).* 2017;12(6):683-702.
- 21 Gao BB, Clermont A, Rook S. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med.* 2007;13:181–188.
- 22 Wolfensberger TJ. Macular Edema - Rationale for Therapy. *Dev Ophthalmol.* 2017;58:74-86.
- 23 Huang Q, Chen R, Lin X, Xiang Z. Efficacy of carbonic anhydrase inhibitors in management of cystoid macular edema in retinitis pigmentosa: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(10):1-10.
- 23 Wolfensberger TJ, Dmitriev AV, Govardovskii VI. Inhibition of membrane-bound carbonic anhydrase decreases subretinal pH and volume. *Doc Ophthalmol.* 1999;97(3):261-271.
- 24 Liew G, Moore AT, Webster AR, Michaelides M. Efficacy and prognostic factors of response to carbonic anhydrase inhibitors in management of cystoid macular edema in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 10:56(3):1531-1536.
- 25 Pepple KL, Nguyen MH, Pakzad-Vaezi K, Williamson K, Odell N, Lee C, ve ark. Response of inflammatory cystoid macular edema to treatment using oral acetazolamide. *Retina.* 2019;39(5):948-955.
- 26 Retina dokusunda yeralan hücre gruplarının şematik gösterimi ve retina tabakalarının histolojik görünümü. 2021.
<https://www.nature.com/articles/eye201694/figures/1>.

- 27 American Academy of Ophthalmology. 2020-2021 Basic and Clinical Science Course Section 02: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. The Eye:47-101.
- 28 Freddo TF, Chaum E. Anatomy of the Eye and Orbit: The Clinical Essentials. Wolters Kluwer Health;2017.
- 29 Snell RS, Lemp MA. Clinical Anatomy of the Eye. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2013.
- 30 Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30:296–323.
- 31 Rizzolo LJ. Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol.* 2007;258:195–234.
- 32 Rizzolo LJ. Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol Histopathol.* 1997;12:1057–1067.
- 33 Reichhart N, Strauss O. Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 2014;126:27–37.
- 34 Cunha-Vaz JG. The blood–retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp. Eye Res.* 2004;78:715–721.
- 35 Reichenbach A, Bringmann A. Müller Cells in the Healthy Retina, in Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. New York, NY: Springer Science Business Media, LLC;2010.
- 36 Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A: Müller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245:627–636.
- 37 Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996;19:307–312.
- 38 Newman EA. A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia.* 1994;11:291–299.
- 39 Newman EA. Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Müller cells of the rat. *Glia.* 1999;26:302–308.
- 40 Ugurlu N. Türkiye’de bir Referans Endokrin Hastalıkları Merkezi’nde Diabet tanısı ile takip edilen hastalarda Diabetik Retinopati Bulgularının İncelenmesi. Ankara 2021. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Projeler Koordinasyon Birimi destekli Kapsamlı Araştırma Projesi. Proje No:3931
- 41 Niven JE, Laughlin SB. Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol.* 2008;211(11):1792–1804.

- 42 Clarke DD, Albers RW. Regulation of Cerebral Metabolic Rate. Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL. Editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
- 43 Howard J, Blakeslee B, Laughlin SB. The intracellular pupil mechanism and photoreceptor signal: noise ratios in the fly *Lucilia cuprina*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1987;231(1265):415–435.
- 44 Sagaties MJ, Raviola G, Schaeffer S, Miller C. The structural basis of the inner blood retina barrier in the eye of *Macaca mulatta*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28:2000-2014.
- 45 Daurich A, Moulin A, Matet A, Kowalczyk L, Nicolas M, Sellam A, et al. Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res* 2018;63:20-68.
- 46 Anand-Apte B, Hollyfield JG. Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature. Besharse J, Bok D, editors. *Encyclopedia of the Eye*. London: Academic Press, Elsevier Books; 2009.
- 47 Klaassen, I, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res*. 2013;34:19-48.
47. Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novel co-culture model of the blood retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and Astrocytes. *Exp Eye Res*. 2012;96(1):181-190.
- 49 Coránguez MD, Ramos C, David AA. The inner Blood-Retinal Barrier: Cellular Basis and Development. *Vision Res*. 2017;139:123–137.
- 50 Pappenheimer JR, Renkin EM, Borrero LM. Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am J Physiol*. 1951;167:13-46.
- 51 Russ PK, Davidson MK, Hoffman LH, Haselton FR. Partial characterization of the human retinal endothelial cell tight and adherens junction complexes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:2479–2485.
- 52 Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. Proteolytic degradation of VEcadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes* 2007;56:2380–2387.
- 53 Manasson J, Tien T, Moore C, Kumar NM, Roy S. High glucose-induced downregulation of connexin 30.2 promotes retinal vascular lesions: implications for diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:2361–2366.
- 54 Danesh-Meyer HV, Zhang J, Acosta ML, Rupenthal ID, Green CR. Connexin43 in retinal injury and disease. *Prog Retin Eye Res*. 2016;51:41–68.
- 55 Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A, Roy S. Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight

- junction barrier function in retinal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:6518–6525.
- 56 Economopoulou M, Hammer J, Wang F, Fariss R, Maminishkis A, Miller SS. Expression, localization, and function of junctional adhesion molecule-C (JAM-C) in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1454–1463.
- 57 Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VEcadherin-mediated cell-cell contacts. *J Exp Med.* 2006;203:2703–2714.
- 58 Palade G. Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries. *Anat. Rec.* 1960;136:254.
- 59 Gu X, Reagan A, Yen A, Bhatti F, Cohen AW, Elliott MH. Spatial and temporal localization of caveolin-1 protein in the developing retina. *Adv Exp Med Biol.* 2014;801:15–21.
- 60 Toda R, Kawazu K, Oyabu M, Miyazaki T, Kiuchi Y. Comparison of drug permeabilities across the blood retinal barrier, blood aqueous humor barrier, and blood brain barrier. *J Pharm Sci.* 2011;100:3904–3911.
- 61 Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 2008;10:923–934.
- 62 Omri, S, Omri, B, Savoldelli, M, Jonet, L, Thillaye-Goldenberg, B., Thuret G, et al. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol.* 2010;4:183–195.
- 63 Nissen MH, Ropke C. Innate and Adaptive Immunity of the Eye, in: J. Fischbarg (Ed.) *The Biology of the Eye.* 2006;10:291–305.
- 64 Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol.* 2011;96(5):614–618.
- 65 McGrath C, Rudman DL, Trentham B. Reshaping understandings of disability associated with age-related vision loss (ARVL): incorporating critical disability perspectives into research and practice. *Disabil Rehabil.* 2017;39(19):1990–1998.
- 66 Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010;87:4–14.
- 67 Wong TY, Sabanayagam C. Strategies to Tackle the Global Burden of Diabetic Retinopathy: From Epidemiology to Artificial Intelligence. *Ophthalmologica.* 2020;243(1):9–20.
- 68 Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(10):2568–2569.

- 69 Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, ve ark. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013;28:169-180.
- 70 Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(2):88-98.
- 71 CDC 2018. Centers for Disease Control and Prevention[Internet].2018 [Erişim Tarihi 30 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/visionhealth/basics/ced/index.html>.
- 72 Ding, J, Wong TY. Current epidemiology of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep.* 2012;12:346–354.
- 73 Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye.* 2002;16(3):242-260.
- 74 Ajlan RS, Silva PS, Sun JK. Vascular Endothelial Growth Factor and Diabetic Retinal Disease. *Semin Ophthalmol.* 2016;31(2):40-48.
- 75 Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991;47:211-218.
- 76 Senger DR, Connolly DT, Van De Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res.* 1990;50:1774-1778.
- 77 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219:983-985.
- 78 Lim JI, Diabetic Retinopathy, in *Ophthalmology*. M. Yanoff, Editor. Elsevier; 2019.
- 79 Lee YJ, Jung SH, Kim SH, Kim MS, Lee S, Hwang J, ve ark. Essential Role of Transglutaminase 2 in Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Vascular Leakage in the Retina of Diabetic Mice. *Diabetes.* 2016;65(8):2414-2428.
- 80 Ran RJ, Zheng XY, Du LP, Zhang XD, Chen XL, Zhu SY. Upregulated inflammatory associated factors and blood-retinal barrier changes in the retina of type 2 diabetes mellitus model. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(11):1591–1597.
- 81 Rangasamy S, McGuire PG, Franco Nitta C, Monickaraj F, Oruganti SR, Das A. Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: role of inflammation in alteration of the blood retinal barrier in diabetic retinopathy. 2014;9:108508.
- 82 Kim SJ, Flach AJ, Jampol LM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in ophthalmology. *Surv Ophthalmol.* 2010;55(2):108-133.

- 83 Zur D, Iglicki M, Loewenstein A. The role of steroids in the management of diabetic macular edema. *Ophthalmic Res.* 2019;62(4):231-236.
- 84 Clermont A, Chilcote TJ, Kita T. Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes.* 2011;60(5):1590–1598.
- 84 Feener EP, Zhou Q, Fickweiler W. Role of plasma kallikrein in diabetes and metabolism. *Thromb Haemost* 2013;110:434–441.
- 85 Clermont A, Murugesan N, Zhou Q. Plasma kallikrein mediates vascular endothelial growth factor–induced retinal dysfunction and thickening. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(6):2390–2399.
- 87 Couture R, Blaes N, Girolami JP. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(2):223–248.
- 88 Kida T, Oku H, Horie T, Fukumoto M, Okuda Y, Morishita S, ve ark. Implication of VEGF and aquaporin 4 mediating Müller cell swelling to diabetic retinal edema. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2017;255:1149-1157.
- 89 Liu J, Feener EP. Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem.* 2013;394(3):319-328.
- 90 Bhatwadekar DA, Kansara VS, Ciulla TA. Investigational plasma kallikrein inhibitors for the treatment of diabetic macular edema: an expert assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2020;29(3):237–244.
- 91 Phipps J, Feener E. The kallikrein–kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int.* 2008;73(10):1114-1119.
- 92 Sağlıklı gözde ve PDR ve DMÖ tanısı olan gözde maküla ve retina dokularının gösterilmesi. 2021. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/diabetic-retinopathy/multimedia/diabetic-macular-edema/img-20124558>
- 93 DRP'ye bağlı olarak retina damar geçirgenliğinde artışı
<http://www.diabetesincontrol.com/handbook-of-diabetes-4th-ed-excerpt-14-diabetic-eye-disease/>
- 94 American Academy of Ophthalmology. Retinal Vascular Disease: Diabetic Retinopathy, in Basic and Clinical Science Course Retina and Vitreous. 2018-2019.
- 95 Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2012;366:1227-1239.
- 96 M. Yanoff. Ocular pathology of diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol.* 1969;67:21-38.

- 97 Praidou A, Androudi S, Brazitikos P, Karakiulakis G, Papakonstantinou E, Dimitrakos S. Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2010;6:304-312.
- 98 Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2004;350:48-58.
- 99 American Academy of Ophthalmology. 2020-2021. Retina and Vitreous. Basic and Clinical Science Course, Section 12. *The Eye*:21-41.
- 99 Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. Pathomechanisms of Cystoid Macular Edema. *Ophthalmic Res.* 2004;36:241–249.
- 100 Marmor MF. Retinal Pigment Epithelium, in *Ophthalmology*. M. Yanoff. editor. Elsevier; 2019.
- 101 Otani T, Yamaguchi Y, Kishi S. Correlation between visual acuity and foveal microstructural changes in diabetic macular edema. *Retina Phila.* 2010;30:774–780.
- 102 Frey T, Antonetti DA. Alterations to the blood-retinal barrier in diabetes: cytokines and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15:1271–1284.
- 103 Whitmire W, Al-Gayyar MM, Abdelsaid M, Yousufzai BK, El- Remessy AB. Alteration of growth factors and neuronal death in diabetic retinopathy: what we have learned so far. *Mol Vis.* 2011;17:300–308.
- 104 Pedersen DB, Koch Jensen P, La Cour M, Kiilgaard JF, Eysteinnsson T, Bang K ve ark. Carbonic anhydrase inhibition increases retinal oxygen tension and dilates retinal vessels. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(2):163-168.
- 105 Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, ve ark. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia.* 1999;26:47–54.
- 106 Spaide RF. Retinal Vascular Cystoid Macular Edema: Review and New Theory. *Retina.* 2016;36(10):1823-1842.
- 107 Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: Role in transepithelial water movement. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2803–2808.
- 108 Fukuda M, Nakanishi Y, Fuse M, Yokoi N, Hamada Y, Fukagawa M, ve ark. Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res.* 2010;90(1):17-25.
- 109 Wolfensberger TJ, Mahieu I, Jarvis-Evans J, Boulton M, Nogradi A, Hollande E, Carter ND, Bird AC. Membrane-bound carbonic anhydrase in

- human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:3401–3407.
- 110 Tsuboi S, Pederson JE. Experimental retinal detachment. X. Effect of acetazolamide on vitreous fluorescein disappearance. *Arch Ophthalmol*. 1985;103:1557-1558.
- 111 Ponnalagu M, Subramani M, Jayadev C, Shetty R, Das D. Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective. *Cytokine*. 2017; 95:126-135.
- 112 Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation*. 1961;24:82–86.
- 113 Danis RP, Hubbard LD, Imaging of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Curr Diabetes Reports*, 2011;11(4): 236-243.
- 114 Fujimoto J, Huang D. Foreword: 25 Years of Optical Coherence Tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(9):OCTi-OCTii.
- 115 Davoudi S. Optical coherence tomography characteristics of macular edema and hard exudates and their association with lipid serum levels in type 2 diabetes. *Retina (Philadelphia, Pa.)*. 2016;36(9):1622.
- 116 Bandello F, Cicinelli MV. 19th EURETINA Congress Keynote Lecture. Diabetic Retinopathy Today. *Ophthalmologica*. 2020;243(3):163-171.
- 117 Zur D, Iglicki M, Busch C, Invernizzi A, Mariussi M, Loewenstein A. International Retina Group. OCT biomarkers as functional outcome predictors in diabetic macular edema treated with dexamethasone implant. *Ophthalmology*. 2018;125(2):267-275.
- 118 Arf S, Sayman I, Hocaoglu M, Ersoz MG. Spectral domain optical coherence tomography classification of diabetic macular edema: a new proposal to clinical practice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2020; 258(6):1165-1172.
- 119 Gray JR, Mosier MA, Ishimoto BM. Optimized protocol for Fluorotron Master. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1985;222(4–5):225–229.
- 120 Cunha-Vaz JG, Goldberg MF, Vygantas C, Noth J. Early detection of retinal involvement in diabetes by vitreous fluorophotometry. *Ophthalmology*. 1979;86:264–275.
- 121 Cunha-Vaz JG, Abreu JRF, Campos AJ. Early breakdown of the blood–retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol*. 1976;59:649–656.
- 122 Tan GS, Cheung N, Simó R, Cheung GC, Wong TY. Diabetic macular oedema. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2017;5(2):143-155.
- 123 The Diabetic Retinopathy Study Research Group. Photocoagulation treatment of proliferative diabetic retinopathy. Clinical application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) findings, DRS Report Number 8. *Ophthalmology*. 1981;88: 583–600.

- 124 Gross JG, Glassman AR, Jampol LM, Inusah S, Aiello LP, Antoszyk AN. Panretinal photocoagulation vs intravitreal ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: A randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2015;314(20):2137–2146.
- 125 Sivaprasad S, Prevost AT, Vasconcelos JC, Riddell A, Murphy C, Kelly J, ve ark. CLARITY Study Group Clinical efficacy of intravitreal aflibercept versus panretinal photocoagulation for best corrected visual acuity in patients with proliferative diabetic retinopathy at 52 weeks (CLARITY): a multicentre, single-blinded, randomised, controlled, phase 2b, non-inferiority trial. *Lancet.* 2017;389(10085):2193-2203.
- 126 Wong TY, Sun J, Kawasaki R, Ruamviboonsuk P, Gupta N, Lansingh VC, ve ark. Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. *Ophthalmology.* 2018; 125(10):1608-1622.
- 127 Massin P, Bandello F, Garweg JG, Hansen LL, Harding SP, Larsen M. Safety and efficacy of ranibizumab in diabetic macular edema (RESOLVE study): A 12-month, randomized, controlled, double-masked, multicenter phase II study. *Diabetes Care.* 2010;33(11):2399–405.
- 128 Heier JS, Korobelnik JF, Brown DM, Schmidt-Erfurth U, Do DV, Midena E, ve ark. Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema: 148-Week Results from the VISTA and VIVID Studies. *Ophthalmology.* 2016;123(11):2376-2385.
- 129 Stefanini FR, Arevalo JF, Maia M. Bevacizumab for the management of diabetic macular edema. *World J Diabetes.* 2013;4(2):19-26.
- 130 Stein JD, Newman-Casey PA, Kim DD, Nwanyanwu KH, Johnson MW, Hutton DW, ve ark. Cost-effectiveness of various interventions for newly diagnosed diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2013;120:1835-1842.
- 131 Kim EJ, Lin WV, Rodriguez SM, Chen A, Loya A, Weng CY. Treatment of Diabetic Macular Edema. *Curr Diab Rep.* 2019;19(9):68.
- 132 Stewart MW. Corticosteroid use for diabetic macular edema: old fad or new trend? *Curr Diab Rep.* 2012;12:364-375.
- 133 Bhagat R, Zhang J. Comparison of the release profile and pharmacokinetics of intact and fragmented dexamethasone intravitreal implants in rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2014;30(10):854–858.
- 134 Daruich A, Matet A, Behar-Cohen F. Sustained-release steroids for the treatment of diabetic macular edema. *Curr Diab Rep.* 2015;15(11):99.
- 135 Campochiaro PA, Brown DM, Pearson A, Chen S, Boyer D, Ruiz-Moreno J, Garretson B, Gupta A, Hariprasad SM, Bailey C, Reichel E, Soubrane G, Kapik B, Billman K, Kane FE, Green K; FAME Study Group. Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous inserts provide benefit for at least 3

- years in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2012;119:2125-2132
- 136 Pearson PA, Comstock TL, Ip M, Callanan D, Morse LS, Ashton P, Levy B, Mann ES, Elliott D. Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: a 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Ophthalmology*. 2011;118:1580-1587.
- 137 Colin J. The role of NSAIDs in the management of postoperative ophthalmic inflammation. *Drugs*. 2007; 67:1291-1308.
- 138 Flach AJ. Topical nonsteroidal antiinflammatory drugs in ophthalmology. *Int Ophthalmol Clin*. 2002;42(1):1-11.
- 139 Russo A, Costagliola C, Delcassi L, Parmeggiani F, Romano MR, Dell'Omo R, ve ark. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for macular edema. *Mediators Inflamm*. 2013;216:1-11.
- 140 Callanan D, Williams P. Topical nepafenac in the treatment of diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*. 2008;2(4):689-692.
- 141 Faghihi H, Yahyapour H, Mahmoudzadeh R, Faghihi S. Comparison of intravitreal bevacizumab and intravitreal diclofenac in the treatment of diabetic macular edema: a 6-month follow-up. *Med. Hypothesis Innov.ETDRS Study report No.1 Arch Ophthalmol Ophthalmol*. 2017;6(3):67-75.
- 142 Ghanbari H, Kianersi F, Sonbolestan SA, Abtahi MA, Akbari M, Abtahi ZA, ve ark. Intravitreal Diclofenac plus Bevacizumab versus Bevacizumab alone in treatment-naive diabetic macular edema: a randomized double-blind clinical trial. *Int Ophthalmol*. 2017;37(4):867-874.
- 143 Kianersi F, Rezaian-Ramsheh A, Pourazizi M, KianersiH. Intravitreal diclofenac for treatment of refractory uveitis-associated cystoid macular oedema: A before and after clinical study. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(3):355-360.
- 144 Sánchez-Santos I, García-Sánchez GA, Gonzalez-Salinas R, Linares-Alba MA, Rodríguez-Reyes AA, García-Santisteban R, ve ark. Intravitreal bromfenac liposomal suspension (100 µg / 0.1 ml). A safety study in rabbit eyes. *Exp Eye Res*. 2020;194-108020.
- 145 Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol Rev*. 1967;47:595–781.
- 146 Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):168-81.
- 147 Kinsey VE, Reddy DVN. Turnover of total carbon dioxide in aqueous humors and the effect thereon of acetazolamide. *Arch Ophthalmol*. 1959;62:78–83.

- 148 Kinsey VE, Barany E. The rate flow of aqueous humor. II. Derivation of rate of flow and its physiologic significance. *Am J Ophthalmol.* 1949;32:189–202.
- 149 Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert Opin Ther Pat.* 2018;28(10):709-712.
- 150 Cox SN, Hay E, Bird AC. Treatment of chronic macular edema with acetazolamide. *Arch Ophthalmol.* 1988;106:1190-1195.
- 151 Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opin Ther Pat.* 2000;10:575-600.
- 152 Kassamali R, Sica DA. Acetazolamide: a forgotten diuretic agent. *Cardiol Rev.* 2011;19(6):276-278.
- 153 Van Berkel MA, Elefritz JL. Evaluating off-label uses of acetazolamide. *Am J Health Syst Pharm.* 2018;75(8):524-531.
- 154 Granero GE, Longhi MR, Becker C, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, Stavchansky S, Dressman JB, Barends DM. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acetazolamide. *J Pharm Sci.* 2008;97(9):3691-3699.
- 155 Sweetman S, editor. 2005. *Martindale: The complete drug reference. Electronic version.* London, UK; Greenwood Village, Colorado: Pharmaceutical Press, Thomson. MICROMEDEX.
- 156 Yano I, Takayama A, Takano M, Inatani M, Tanihara H, Ogura Y ve ark.. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetazolamide in patients with transient intraocular pressure elevation. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998;54:63-68.
- 157 Parasrampur J. 1993. In: Brittain HG, editor. *Analytical profiles of drug substances and excipients.* Vol. 22 San Diego, London: Academic Press. pp 3-32.
- 158 Corbett JT. Acetazolamide and purpura. *Br Med J.* 1985;1:1122-1123.
- 159 Englund GW. Fatal pancytopenia and acetazolamide therapy. *JAMA.* 1969; 210:2282.
- 160 Niven BI, Manoharan A. Acetazolamide-induced anaemia. *Med J.* 1985;1:1500-1505.
- 161 USP 28-NF 23. *The United States Pharmacopeia-The National Formulary.* Rockville MD2085: The United States Pharmacopeial Convention, Inc. . 2005.
- 162 Griesser UJ, Burger A, Mereiter K. The polymorphic drug substances of the European Pharmacopoeia. Part 9. Physicochemical properties and crystal structure of acetazolamide crystal forms. *J Pharm Sci.* 1997; 86:352-358.

163. Pudipeddi M, Serajuddin ATM. Trends in solubility of polymorphs. *J Pharm Sci.* 2005; 94:929-939.
164. Singla AK, Kaur IP, Garg A, Aggarwal D. Novel approaches for topical delivery of acetazolamide. *Pharmaceutical Technology.* 2002;26:24-34.
165. Duffel MW, Ing IS, Segarra TM, Dixson JA, Barfknecht CF, Schoenwald RD. Substituted sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with topical effects on intraocular pressure. *J Med Chem.* 1986;29:1488-1494.
- 166 WHO, Model List of Essential Medicines 13th edn. Available from URL www.who.int/medicines/organization/par/edl/expcom13/eml13_en.doc
- 167 Ritschel WA, Paulos C, Arancibia A, Agrawal MA, Wetzelsberger KM, Lucker PW. Pharmacokinetics of acetazolamide in healthy volunteers after short- and long-term exposure to high altitude. *J Clin Pharmacol.* 1998;38:533-539.
- 168 Ellis PP, Price PK, Kelmenson R, Rendi MA. Effectiveness of generic acetazolamide. *Arch Ophthalmol.* 1982;100(12):1920-1922.
- 169 Schulz M, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie.* 2003; 58:447-473.
- 170 Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennerna's H, Hussain AS ve ark. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm.* 2004; 1:85-96.
- 171 Wu C-Y, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/ absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res.* 2005; 22:11-23.
- 172 Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pham Biopharm.* 2004; 58:265-278.
- 173 Pepple KL, Nguyen MH, Pakzad-Vaezi K, Williamson K, Odell N, Lee C, ve ark. Response of inflammatory cystoid macular edema to treatment using oral acetazolamide. *Retina.* 2019;39(5):948-955.
- 174 Moldow B, Sander B, Larsen M, Lund-Andersen H. Effects of acetazolamide on passive and active transport of fluorescein across the normal BRB. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40: 1770-1775.
- 175 Kawasaki K, Mukoh S, Yonemura D, Fujii S, Segawa Y. Acetazolamide-induced changes of the membrane potentials of the retinal pigment epithelial cell. *Doc Ophthalmol.* 1986; 63:375-381.
- 176 Zeitz O, Keserü M. Kallikrein-kinin activation by altered vitreous pH: New perspectives for treatment and pathogenesis of diabetic macular edema?: Comment on: Gao BB et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates

- hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med.* 2007;13(2):181-8. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(12):1745-1747.
- 177 Gao BB, Chen X, Timothy N. Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res.* 2008;7 (6):2516-2525.
- 178 Murakami T. Kallikrein-Kinin System: An Emerging Competitor or Collaborator for VEGF in Diabetic Macular Edema? *Diabetes.* 2015;64(10):3350-3352.
- 179 Kita T, Clermont AC, Murugesan N. Plasma kallikrein-kinin system as a VEGF-independent mediator of diabetic macular edema. *Diabetes.* 2015;64(10):3588-3599.
- 180 Kaur IP, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: Future perspective in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002;248:1-14.
- 181 Kass MA, Kolker AE, Gordon M, Goldberg I, Gieser DK, Krupin T, ve ark. Acetazolamide and urolithiasis. *Ophthalmology.* 1981;88(3):261-265.
- 182 Kassamali R, Sica DA. Acetazolamide: a forgotten diuretic agent. *Cardiol Rev.* 2011;19(6):276-278.
- 183 Van Berkel MA, Elefritz JL. Evaluating off-label uses of acetazolamide. *Am J Health Syst Pharm.* 2018;75(8):524-531.
- 184 McCannel CA. Meta-analysis of endophthalmitis after intravitreal injection of anti-vascular endothelial growth factor agents: causative organisms and possible prevention strategies. *Retina.* 2011;31(4):654-661.
- 185 Baudin F, Benzenine E, Mariet AS, Bron AM, Daien V, Korobelnik JF, ve ark. Association of acute endophthalmitis with intravitreal injections of corticosteroids or anti-vascular growth factor agents in a nationwide study in France. *JAMA Ophthalmol.* 2018;136(12):1352-1358.
- 186 Thrane AS, Hove M, Kjersem B, Krohn J. Acute retinal necrosis and ocular neovascularization caused by cytomegalovirus following intravitreal dexamethasone implant (Ozurdex®) in an immunocompetent patient. *Acta Ophthalmol.* 2016;94:813-814.
- 187 Vertes D, Snyers B, De Potter P. Cytomegalovirus retinitis after low-dose intravitreal triamcinolone acetonide in an immunocompetent patient: A warning for the widespread use of intravitreal corticosteroids. *Int Ophthalmol.* 2010;30:595-597.
- 188 Fung AE, Rosenfeld PJ, Reichel E. The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey: using the internet to assess drug safety worldwide. *Br J Ophthalmol.* 2006;90(11):1344-1349.

- 189 Chong DY, Anand R, Williams PD, Qureshi JA, Callanan DG. Characterization of sterile intraocular inflammatory responses after intravitreal bevacizumab injection. *Retina*. 2010;30(9):1432-1440.
- 190 Meyer CH, Michels S, Rodrigues EB, Hager A, Mennel S, Schmidt JC, ve ark. Incidence of rhegmatogenous retinal detachments after intravitreal anti-vascular endothelial factor injections. *Acta Ophthalmol*. 2011;89:70-75.
- 191 Oliveira MA, Farinha C, Rodrigues TM, Martins A, Cachulo MDL, Marques JP, ve ark. Macular atrophy development in neovascular age-related macular degeneration during first year of treatment: Incidence and risk factors. *Eur J Ophthalmol*. 2020;27:1-8.
- 192 Rieveschl NB, Song W, Li A, Conti TF, Hom GL, Tsai GJ, ve ark. Macular Atrophy Affecting Visual Outcomes in Patients Undergoing Anti-VEGF Treatment in Routine Clinical Practice. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina*. 2020;51(2):68-75.
- 193 Grunwald JE, Daniel E, Huang J, Ying G, Maugire MG, Toth CA. et al. Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology*. 2014;121:150-161.
- 194 Willmann G, Nepomuceno AB, Messias K, Barroso L, Scott IU, Messias A, ve ark. Foveal thickness reduction after anti-vascular endothelial growth factor treatment in chronic diabetic macular edema. *Int J Ophthalmol*. 2017;10(5):760-764.
- 195 Razeghinejad MR, Katz LJ. Steroid-induced iatrogenic glaucoma. *Ophthalmic Res* 2012;47:66-80.
- 196 Good TJ, Kimura AE, Mandava N, Kahook MY. Sustained elevation of intraocular pressure after intravitreal injections of anti-VEGF agents. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:1111-1114.
- 197 Gillies MC, Lim LL, Campain A, Quin GJ, Salem W, Li J, ve ark. A randomized clinical trial of intravitreal bevacizumab versus intravitreal dexamethasone for diabetic macular edema: the BEVORDEX study. *Ophthalmology*. 2014;121:2473-2481.
- 198 Boyer DS, Yoon YH, Belfort R Jr, Bandello F, Maturi RK, Augustin AJ, ve ark. Three-year, randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2014;121:1904-1914.
- 199 Papastavrou VT, Zambarakji H, Dooley I, Eleftheriadis H, Jackson TL. Observation: Fluocinolone acetonide (Iluvien) implant migration into the anterior chamber. *Retin Cases Brief Rep* 2017;11:44-46.
- 200 Gonçalves MB, Alves BQ, Moura R, Magalhães O Jr, Maia A, Belfort R Jr, ve ark. Intravitreal dexamethasone implant migration into the anterior chamber: A multicenter study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Retina*. 2020;40:825-832.

- 201 Schargus M, Frings A. Issues with Intravitreal Administration of Anti-VEGF Drugs. *Clin Ophthalmol*. 2020;14:897-904.
- 202 Gonzalez VH, Campbell J, Holekamp NM, Kiss S, Loewenstein A, Augustin AJ, ve ark. Early and long-term responses to anti-vascular endothelial growth factor therapy in diabetic macular edema: analysis of protocol I Data. *Am J Ophthalmol*. 2016;172:72-79.
- 203 Bressler NM, Beaulieu WT, Maguire MG, Glassman AR, Blinder KJ, Bressler SB ve ark. Early response to anti-vascular endothelial growth factor and two-year outcomes among eyes with diabetic macular edema in protocol T. *Am J Ophthalmol*. 2018;195:93-100.
- 204 Brown DM, Nguyen QD, Marcus DM. RIDE and RISE Research Group. Long-term outcomes of ranibizumab therapy for diabetic macular edema: the 36-month results from two phase III trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*. 2013;120:2013-2022.
- 205 Elman MJ, Aiello LP, Beck RW. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2010;117:1064-1077.
- 206 Santos AR, Costa MA, Schwartz C, Alves D, Figueira J, Silva R ve ark. Optical coherence tomography baseline predictors for initial best-corrected visual acuity response to intravitreal antivascular endothelial growth factor treatment in eyes with diabetic macular edema: the chartres study. *Retina*. 2018;38(6):1110–1119.
- 207 Bressler SB, Qin H, Beck RW. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Factors associated with changes in visual acuity and central subfield thickness at 1 year after treatment for diabetic macular edema with ranibizumab. *Arch Ophthalmol*. 2012;130:1153-1161.
- 208 Sun JK, Lin MM, Lammer J, Prager S, Sarangi R, Silva PS, ve ark. Disorganization of the retinal inner layers as a predictor of visual acuity in eyes with center-involved diabetic macular edema. *JAMA Ophthalmol*. 2014;132:1309-1316.
- 209 Joltikov KA, Sesi CA, de Castro VM, Davila JR, Anand R, Khan SM ve ark. Disorganization of Retinal Inner Layers (DRIL) and Neuroretinal Dysfunction in Early Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018; 59(13):5481-5486.
- 210 Thrimawithana TR, Young S, Bunt CR. Drug delivery to the posterior segment of the eye. *Drug Discov Today*. 2011;16(5-6):270-277.
- 211 Moisseiev E, Loewenstein A. Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye. *Dev Ophthalmol*. 2017;58:87-101.
- 212 Achouri D, Alhanout K, Piccerelle P. Recent advances in ocular drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2012;4:1-19

- 213 Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M. Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1430-1438.
- 214 Sigurdsson HH, Konráðsdóttir F, Loftsson T, Stefánsson E. Topical and systemic absorption in delivery of dexamethasone to the anterior and posterior segments of the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 2007;85:598-602.
- 215 Lee TW, Robinson JR. Drug delivery to the posterior segment of the eye: some insights on the penetration pathways after subconjunctival injection. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001;17:565-572.
- 216 Cheruvu NP, Amrite AC, Kompella UB. Effect of eye pigmentation on transscleral drug delivery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:333-341.
- 217 Cheruvu CPS, Ayalashomayajula SP, Kompella UB. Retinal delivery of sodium fluorescein, budesonide, and celecoxib following subconjunctival injection. *Drug Del Technol*. 2003;3:62-67.
- 218 Boddu SHS, Nesamony J. Utility of transporter/receptor(s) in drug delivery to the eye. *World J Pharmacol*. 2013;2:1-17.
- 219 Hughes PM, Olejnik O, Chang-Lin JE, Wilson CG. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57:2010-2032.
- 220 Grzybowski, A, Told, R, Sacu, S, Bandello, F, Moisseiev, E, Loewenstein, A, Schmidt Erfurth, U, Board, Euretina. Update on intravitreal injections: euretina expert consensus recommendations. *Ophthalmologica*. 2018;239: 181-193.
- 221 Varela-Fernández R, Díaz-Tomé V, Luaces-Rodríguez A, Conde-Penedo A, García-Otero X, Luzardo-Álvarez A. Drug delivery to the posterior segment of the eye: Biopharmaceutic and pharmacokinetic considerations. *Pharmaceutics*. 2020;12(3): 269.
- 222 Maurice D. Review: practical issues in intravitreal drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2001;17:393-401.
- 223 Kelly TS. A note on intravitreal penicillin. *Br J Ophthalmol*. 1948;32: 153.
- 224 Leopold IH. Intravitreal penetration of penicillin and penicillin therapy of infections of the vitreous. *Arch Ophthalmol*. 1945;33:211-216.
- 225 Doshi RR, Leng T, Fung AE,. Povidone-iodine before lidocaine gel anesthesia achieves surface antisepsis. *Ophthalmic Surg Laser Imag*. 2011b: 42, 346–349.
- 226 Wong TY, Sun J, Kawasaki R, Ruamviboonsuk P, Gupta N, Lansingh VC, ve ark. Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. *Ophthalmology*. 2018;125(10):1608-1622.

- 227 Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, Jampol LM, Aiello LP. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. *N Engl J Med.* 2015;372:1193-1203.
- 227 Browning DJ, Stewart MW, Lee C. Diabetic macular edema: Evidence-based management. *Indian J Ophthalmol.* 2018;66(12):1736-1750.
- 228 Wecker T, Ehlken C, Bühler A, Lange C, Agostini H, Böhringer D, ve ark. Five-year visual acuity outcomes and injection patterns in patients with pro-re-nata treatments for AMD, DME, RVO and myopic CNV. *Br J Ophthalmol* 2017;101:353-359.
- 229 Dugel PU, Layton A, Varma RB. Diabetic macular edema diagnosis and treatment in the real world: An analysis of medicare claims data (2008 to 2010). *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina* 2016;47:258-267.
- 230 Holekamp NM, Campbell J, Almony A, Ingraham H, Marks S, Chandwani H, ve ark. Vision outcomes following anti vascular endothelial growth factor treatment of diabetic macular edema in clinical practice. *Am J Ophthalmol.* 2018;191:83-91.
- 231 Gao X, Obeid A, Aderman CM, Talcott KE, Ali FS, Adam MK, ve ark. Loss to follow-up after intravitreal anti-vascular endothelial growth factor injections in patients with diabetic macular dema. *Ophthalmol Retina.* 2019;3:230-236.
- 232 Awwad S, Mohamed Ahmed AHA, Sharma G, Heng JS, Khaw PT, Brocchini S, Lockwood A. Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol.* 2017;174(23):4205-4223.
- 233 Bhatt P, Kelly S, Sutariya V. Nanoscale delivery systems in treatment of posterior ocular neovascularization: strategies and potential applications. *Ther Deliv.* 2019 Nov;10(11):737-747.
- 234 Campos EJ, Campos A, Martins J, Ambrósio AF Opening eyes to nanomedicine: Where we are, challenges and expectations on nanotherapy for diabetic retinopathy. *Nanomedicine.* 2017;13(6):2101-2113.
- 235 Mehra NK, Cai D, Kuo L, Hein T, Palakurthi S. Safety and toxicity of nanomaterials for ocular drug delivery applications. *Nanotoxicology.* 2016;10(7):836-860.
- 236 Bansal P, Garg S, Sharma Y, Venkatesh P. Posterior Segment Drug Delivery Devices: Current and Novel Therapies in Development. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2016;32(3):135-144.
- 237 Labhasetwar V. Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16:674–680.
- 237 Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnol.* 2007;2:751-760.

- 238 Selvaraj K, Gowthamarajan K, Karri VV, Barauah UK, Ravisankar V, Jojo GM. Current treatment strategies and nanocarrier based approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy. *J Drug Target*. 2017;25(5):386-405.
- 239 Huang X, Chau Y. Intravitreal nanoparticles for retinal delivery. *Drug Discov Today*. 2019;24(8):1510-1523.
- 240 Tsai CH, Wang PY, Lin IC, Huang H, Liu GS, Tseng CL. Ocular drug delivery: Role of degradable polymeric nanocarriers for ophthalmic application. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9):2830.
- 241 Bourges JL, Bloquel C, Thomas A. Intraocular implants for extended drug delivery: therapeutic applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58:1182–1202.
- 242 Malanga M, Szemán J, Fenyvesi É, Puskás I, Csabai K, Gyémánt G, ve ark. “Back to the future” new look at hydroxypropyl beta-cyclodextrins. *J Pharm Sci*. 2016;105:2921–2931.
- 243 Matencio A, Caldera F, Cecone C, López-Nicolás JM, Trotta F. Cyclic Oligosaccharides as active drugs, an updated review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;29;13(10):281.
- 244 Fourmentin S. Crini G. Lichtfouse A. editors) *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis; Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Germany: Springer International Publishing; 2018.
- 245 Jacob S Nair AB. Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug Dev Res*. 2018;79(5):201-217.
- 246 Vecsernyés M, Fenyvesi F, Bácskay I, Deli MA, Szenté L, Fenyvesi É. Cyclodextrins, blood-brain barrier, and treatment of neurological diseases. *Arch Med Res*. 2014;45(8):711-729.
- 247 Szejtli J. *Cyclodextrin Technology*. Dordrecht: Kluwer; 1988.
- 248 FDA List of Inactive Pharmaceutical Ingredients. [Internet]. [Erişim Tarihi 18 Mart 2018]. Erişim adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm?event=browseByLetter.page&Letter=H>
- 249 Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm*. 2018;535(1-2): 272-284.
- 250 Loftsson T, Hreinsdottir D, Stefansson E. Cyclodextrin microparticles for drug delivery to the posterior segment of the eye: aqueous dexamethasone eye drops. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(5):629-635.
- 251 Loftsson T, Hreinsdottir D, Konradsdottir F. Dexamethasone delivery to posterior segment of the eye. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*. 2007;57:585-589.

- 252 Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 2007;329:1-11.
- 253 Brewster ME, Loftsson T, Bodor N. Applications of chemically-modified cyclodextrins: use of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as an enabling excipient for brain targeting, redox-based derivatives of estradiol a review of preclinical and clinical findings. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2004;14(1):21-34.
- 254 Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ, Dietschy JM. Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc^{-/-} mouse. *PNAS*. 2009;106(7):2377-2382.
- 255 FDA Orphan Drug Designations. [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 18 Ocak 2020]. Erişim adresi: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/opdlisting/oopd/OOPD_Results_2.cfm?Index_Number%2F303910.
- 256 Loftsson T, Brewster ME, Derendorf H, Bodor N. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: properties and usage in pharmaceutical formulations. *PZ Wiss*. 1991;4(1):5-10.
- 257 Palem CR, Chopparapu KS, Subrahmanyam PV, Yamsani MR. Cyclodextrins and their derivatives in drug delivery: A review. *Curr Trends Biotechnol & Pharm*. 2012;6(3):255–275.
- 258 Jóhannesson G, Stefánsson E, Loftsson T. Microspheres and nanotechnology for drug delivery. *Dev Ophthalmol*. 2016;55:93-103.
- 259 Jóhannsdóttir S, Kristinsson JK, Fülöp Z, Asgrímsdóttir G, Stefánsson, E, Loftsson T. Formulations and toxicologic in vivo studies of aqueous cyclosporin a eye drops with cyclodextrin nanoparticles. *Int J Pharmaceut*. 2017;529(1–2):486-490.
- 260 Wang Y, Xu X, Gu Y, Cheng Y, Cao F. Recent advance of nanoparticle-based topical drug delivery to the posterior segment of the eye. *Expert Opin Drug Deliv*. 2018;15(7): 687-701.
- 261 Koller M. Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications. *Molecules*. 2018;23:1-20.
- 262 Masood F, Yasin T, Hameed A. Polyhydroxyalkanoates – What are the uses? Current challenges and perspectives. *Crit Rev Biotechnol*. 2015;35:514-521.
- 263 Akaraonye E, Keshavarz T, Roy I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010;85:732-743.
- 264 Babel W, Steinhbüchel A. Biopolyesters. Special Issue of *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer-Verlag; 2001.

- 265 Jacquelin N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem Eng J.* 2008;39:15-27.
- 246 Volova T, Shishatskaya E, Sevastianov V, Efremov S, Mogilnaya O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochem Eng J.* 2013;16:125-133.
- 267 Showalter MR, Cajka T, Fiehn O. 2017. Epimetabolites: discovering metabolism beyond building and burning. *Curr Opin Chem Biol.*36:70-76.
- 268 Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;53:5-21.
- 269 Duan B, Cheung WL, Wang M. Optimized fabrication of Ca – P / PHBV nanocomposite scaffolds via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Biofabrication* 2011;3(1):015001.
- 270 Vilos C, Morales FA, Solar PA, Herrera NS, Gonzalez-Nilo FD, Aguayo DA, ve ark. aclitaxel-PHBV nanoparticles and their toxicity to endometrial and primary ovarian cancer cells. *Biomaterials.* 2013;34:4098-4108.
- 271 Aksungur P, Demirbilek M, Denkba EB, Vandervoort J, Ludwig A. Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *J Control Release.* 2011;151:286-294.
- 272 Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Silva AC, Lobo JMS. Applications of polymeric and lipid nanoparticles in ophthalmic pharmaceutical formulations: present and future considerations. *J Pharm Pharm Sci.* 2014;17:278.
- 273 Mains J, Wilson CG. The vitreous humor as a barrier to nanoparticle distribution. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013;29(2):143-150.
- 274 Castro-Balado A, Mondelo-García C, González-Barcia M, Zarra-Ferro I, Otero-Espinar FJ, Ruibal-Morell Á, ve ark. Ocular biodistribution studies using molecular imaging. *Pharmaceutics.* 2019;11:237.
- 275 Peynshaert K, Devoldere J, De Smedt SC, Remaut K. In vitro and ex vivo models to study drug delivery barriers in the posterior segment of the eye. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;126:44-57.
- 276 Hosoya K, Tachikawa M. Inner Blood-Retinal Barrier Transporters: Role of Retinal Drug Delivery. *Pharm Res.* 2009;26:2055-2065.
- 277 Xu Q, Boylan NJ, Suk JS, Wang YY, Nance EA, Yang JC, ve ark. Nanoparticle diffusion in and microrheology of the bovine vitreous ex vivo. *J Control Release.* 2013;167:76-84.
- 278 Bourges JL. Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;44:3562-3569.

- 279 Koo H, Moon H, Han H, Na JH, Huh MS, Park JH, ve ark. The movement of self-assembled amphiphilic polymeric nanoparticles in the vitreous and retina after intravitreal injection. *Biomaterials*. 2012;33(12):3485-93.
- 280 Dalkara D. Inner limiting membrane barriers to aav-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther*. 2009;17:2096-2102.
- 281 Jackson TL, Antcliff RJ, Hillenkamp J, Marshall J. Human retinal molecular weight exclusion limit and estimate of species variation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2141-2146.
- 282 Tao Y, Li X, Jiang Y, Bai X, Wu B, Dong J. Diffusion of macromolecule through retina after experimental branch retinal vein occlusion and estimate of intraretinal barrier. *Curr Drug Metab*. 2007;8:151-156.
- 283 ICH guideline M10 on bioanalytical method validation. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf.
- 284 Du Y.Z., Xu J.G., Wang L., Yuan H., Hu F.Q., Preparation and characteristics of hydroxypropyl- β -cyclodextrin polymeric nanocapsules loading nimodipine. *Eur Polymer J*. 2009;45:1397–1402.
- 285 Lu Y., Liu S., Zhao Y., Zhu L., Yu S., Complexation of Z-ligustilide with hydroxypropyl- β -cyclodextrin to improve stability and oral bioavailability, *Acta Pharmaceut*. 2014; 64(2): 211-222.
- 286 Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, et al. A novelco-culture model of the blood retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and Astrocytes. *Exp Eye Res*. 2012;96(1):181-190.
- 287 Suarez, S., McCollum, G. W., Bretz, C. A., Yang, R., Capozzi, M. E., Penn, J. S.. Modulation of VEGF-Induced Retinal Vascular Permeability by Peroxisome ProliferatorActivated Receptor- β / δ ” *Investigative ophthalmology&visual science*. 2014;55(12) 8232-8240.
- 288 Malek G, Busik J, Grant MB. Choudhary M.Models of retinal diseases and their applicability in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2018;13(4):359-377.
- 289 Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology*. 1996;103(11):1820–1828.
- 290 Ozaki H, Hayashi H, Viores SA. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res*. 1997;64(4):505–517.
- 291 Arana LA, Pinto AT, Chader GJ, Barbosa JD, Morales S, Moreira AT, Maia M, Humayun MS.Fluorescein angiography, optical coherence tomography, and histopathologic findings in a VEGF(165) animal model of retinal angiogenesis. *Graefes Arch Clin*. 2012;250(10):1421-1428.

- 292 Ameri H, Chader GJ, Kim JG, Sadda SR, Rao NA, Humayun MS. The effects of intravitreal bevacizumab on retinal neovascular membrane and normal capillaries in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(12):5708-5715.
- 293 Muraoka Y, Ikeda HO, Nakano N, Hangai M, Toda Y, Okamoto-Furuta K, Kohda H, Kondo M, Terasaki H, Kakizuka A, Yoshimura N. Real-time imaging of rabbit retina with retinal degeneration by using spectral-domain optical coherence tomography. *PLoS One.* 2012;7(4):e36135.
- 294 Bartuma H, Petrus-Reurer S, Aronsson M, Westman S, André H, Kvanta A. In vivo imaging of subretinal bleb-induced outer retinal degeneration in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56(4):2423-2430
- 295 Lavaud A, Soukup P, Martin L, Hartnack S, Pot. Spectral domain optical coherence tomography in awake rabbits allows identification of the visual streak, a comparison with histology. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(5):13.
- 296 Cheng J, Sohn EH, Jiao C, Adler KL, Kaalberg EE, Russell SR, et al. Correlation of optical coherence tomography and retinal histology in normal and Pro23His retinal degeneration Pig *Transl Vis Sci Technol.* 2018;7(6):18.
- 297 Morera Y, González R, Lamdan H, Pérez L, González Y, Agüero J, Castro J, Romero JC, Etchegoyen AY, Ayala M, Gavilondo JV. Vaccination with a mutated variant of human Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) blocks VEGF-induced retinal neovascularization in a rabbit experimental model. *Exp Eye Res.* 2014;122:102-109.
- 298 Hou H, Wang C, Nan K, Freeman WR, Sailor MJ, Cheng L. Controlled Release of Dexamethasone From an Intravitreal Delivery System Using Porous Silicon Dioxide *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(2):557-566.
- 299 Nuzzi G, Venturini I, De Gregorio M, Arsenio L, Maraini G. Vitreous fluorophotometry and changes in blood-retinal barrier permeability induced by bendazac lysine. *Acta Ophthalmol Scand.* 1997;75(1):41-43.
- 300 RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA, USA
- 301 IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, N: IBM Corp.
- 302 Verma P, Gupta RN, Jha AK, Pandey R. Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide. *Drug Deliv.* 2013;20(7):269-276.
- 303 Shabir GA. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *J Validation Technol.* 2005;10:314-325.
- 304 Gonzalez AG, Herrador MA. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends Anal Chem.* 2007;26(3):227-238
- 305 Marsh DA. Selection of Drug Delivery Approaches for the Back of the Eye: Opportunities and Unmet Needs. In *Drug Product Development for the Back*

- of the Eye. Springer Science & Business Media. Berlin/Heidelberg, Germany;2011.
- 306 Sakurai E, Ozeki H, Kunou N, Ogura Y. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. *Ophthalmic Res* .2001;33:31e6.
- 307 Nishihara H.Studies on the ultrastructure of the inner limiting membrane of the retina--distribution of anionic sites in the inner limiting membrane of the retina].*Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1991;95(10):951-958
- 308 Nishihara H.*Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. Studies on the ultrastructure of the inner limiting membrane of the retina. I. Surface replication study on the inner limiting membrane of the retina. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1989;93(4):429-438.
- 309 Shang L, Nienhaus K, Nienhaus GU. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J Nanobiotechnol*. 2014;12:5.
- 310 Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC ve ark.Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell.*Chem Soc Rev*. 2017;46(14):4218-4244.
- 311 Kimura H, Ogura Y, Moritera T, Honda Y, Tabata Y, Ikada Y In vitro phagocytosis of polylactide microspheres by retinal pigment epithelial cells and intracellular drug release. *Curr Eye Res*. 1994;13(5):353-360.
- 312 Giannaccini M, Giannini M, Calatayud MP, Goya GF, Cuschieri A, Dente L, Raffa V . Magnetic nanoparticles as intraocular drug delivery system to target retinal pigmented epithelium (RPE). *Int J Mol Sci*. 2014;15(1):1590-1605.
- 313 Raju HB, Hu Y, Padgett KR, Rodriguez JE, Goldberg JL Investigation of nanoparticles using magnetic resonance imaging after intravitreal injection.*Clin Exp Ophthalmol*. 2012 ; 40(1): 100-107.
- 314 Kim H, Robinson SB, Csaky KG.Investigating the movement of intravitreal human serum albumin nanoparticles in the vitreous and retina. *Pharm Res*. 2009;26(2):329-37.
- 315 Gan L, Wang J, Zhao Y, Chen D, Zhu C, Liu J, Gan Y.Hyaluronan-modified core-shell liponanoparticles targeting CD44-positive retinal pigment epithelium cells via intravitreal injection. *Biomaterials*. 2013;34(24):5978-5987.
- 316 Peeters L, Sanders NN, Braeckmans K, Boussery K, Van de Voorde J, De Smedt SC, Demeester J. Vitreous: a barrier to nonviral ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(10):3553-3561.
- 317 Eriksen AZ, Brewer J, Andresen TL, Urquhart AJ. The diffusion dynamics of PEGylated liposomes in the intact vitreous of the ex vivo porcine eye: A fluorescence correlation spectroscopy and biodistribution study. *Int J Pharm*. 2017;30;522(1-2):90-97.

- 318 Pitkänen L, Pelkonen J, Ruponen M, Rönkkö S, Urtti A. Neural retina limits the nonviral gene transfer to retinal pigment epithelium in an in vitro bovine eye model. *AAPS J.* 2004;6(3):e25.
- 319 Huang X, Chau Y. Investigating impacts of surface charge on intraocular distribution of intravitreal lipid nanoparticles. *Exp Eye Res.* 2019;186:107711.
- 320 Borhani H, Rahimy MH, Peyman GA. Vitreoretinal toxicity of acetazolamide following intravitreal administration in the rabbit eye. *Ophthalmic Surg.* 1994;25(3):166-169.
- 321 Zhang P, Liu X, Hu W, Bai Y, Zhang L. Preparation and evaluation of naringenin-loaded sulfobutylether- β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles for ocular drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2016;20(149):224-230.
- 322 Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials.* 2007;28(2):354-369.
- 323 Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005;60(2):207-225.
- 324 Barar J, Asadi M, Mortazavi-Tabatabaei SA, Omid Y. Ocular drug delivery; impact of in vitro cell culture models. *J Ophthalmic Vis Res.* 2009;4:238–252.
- 325 ISO 10993-5. (2009) Biological evaluation of medical devices—Part 5: tests for in vitro cytotoxicity.
- 326 Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *J Control Release.* 2009;136:2-13.
- 327 Behar-Cohen F. Recent advances in slow and sustained drug release for retina drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2019;16(7):679-686.
- 328 Li H, Palamoor M, Jablonski MM. Poly(ortho ester) nanoparticles targeted for chronic intraocular diseases: ocular safety and localization after intravitreal injection. *Nanotoxicology.* 2016;10(8):1152-1159.
- 329 De Paiva MRB, Lage NA, Guerra MCA, Mol MPG, Ribeiro MCS, Fulgêncio GO, et al. Toxicity and in vivo release profile of sirolimus from implants into the vitreous of rabbits' eyes. *Doc Ophthalmol.* 2019;138(1):3-19.
- 330 Musa F, Srinivasan S, King CM, Kamal A. Raised intraocular pressure and orbital inflammation: a rare IgE-mediated allergic reaction to sub-Tenon's hyaluronidase. *J Cataract Refract Surg.* 2006;32:177-178.
- 331 Taniguchi T, Kawakami H, Sawada A, Iwaki M, Tsuji A, Sugiyama K, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on intraocular pressure and ocular inflammation following laser irradiation in rabbits. *Curr Eye Res.* 1998;17:308-315.

- 332 Fleenor DL, Shepard AR, Hellberg PE, Jacobson N, Pang IH, Clark AF. TGFbeta2-induced changes in human trabecular meshwork: implications for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:226-234.
- 333 Zou L, Nair A, Weng H, Tsai YT, Hu Z, Tang L. Intraocular pressure changes: an important determinant of the biocompatibility of intravitreal implants. *PLoS One*. 2011;6(12): 28720.
- 334 Morshedi RG, Ricca AM, Wirostko BM. Ocular Hypertension Following Intravitreal Antivascular Endothelial Growth Factor Therapy: Review of the Literature and Possible Role of Nitric Oxide. *J Glaucoma*. 2016;25(3):291-300.
- 335 Inatani M, Iwao K, Kawaji T, Hirano Y, Ogura Y, Hirooka K, et al. Intraocular pressure elevation after injection of triamcinolone acetonide: a multicenter retrospective case-control study. *Am J Ophthalmol*. 2008;145(4):676-681.
- 336 Adelman RA, Zheng Q, Mayer HR. Persistent ocular hypertension following intravitreal bevacizumab and ranibizumab injections. *J Ocular Pharmacol Ther*. 2010;26:105-110.
- 337 Sniegowski M, Mandava N, Kahook MY. Sustained intraocular pressure elevation after intravitreal injection of bevacizumab and ranibizumab associated with trabeculitis. *Open Ophthalmol J*. 2010;4:28-29.
- 338 Kamath S, Bhattacharyya D, Padukudru C, Timmons RB, Tang L. Surface chemistry influences implant-mediated host tissue responses. *J Biomed Mater Res*. 2008;86:617-626.
- 339 Li H, Palamoor M, Jablonski MM. Poly(ortho ester) nanoparticles targeted for chronic intraocular diseases: ocular safety and localization after intravitreal injection. *Nanotoxicology*. 2016;10(8):1152-1159.
- 340 Nair A, Zou L, Bhattacharyya D, Timmons RB, Tang L. Species and density of implant surface chemistry affect the extent of foreign body reactions. *Langmuir*. 2008;24:2015-2024.
- 341 Weng H, Zhou J, Tang L, Hu Z. Tissue responses to thermally-responsive hydrogel nanoparticles. *J Biomater Sci Polym*. 2004;15:1167-1180.
- 342 Jiang S, Franco YL, Zhou Y, Chen J. Nanotechnology in retinal drug delivery. *Int J Ophthalmol*. 2018;11(6):1038-1044.
- 343 O'Rourke M, Hanes J. Ocular drug delivery via micro-and nanoparticles. *Retin. Today*. 2014:84-87.
- 344 Braga SS. Cyclodextrins: Emerging medicines of the new millennium. *Biomolecules*. 2019;9(12):801.
- 345 Schnichels S, Paquet-Durand F, Löscher M, Tsai T, Hurst J, Joachim SC, et al. Retina in a dish: Cell cultures, retinal explants and animal models for common diseases of the retina. *Prog Retin Eye Res*. 2020;25:100880.

- 346 Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest.* 1996;74:819-825.
- 347 Mesquida M, Drawnel F, Lait PJ, Copland DA, Stimpson ML, Llorenç V, ve ark. Modelling Macular Edema: The Effect of IL-6 and IL-6R Blockade on human blood-retinal barrier integrity in vitro. *Transl Vis Sci Technol.* 2019;8(5):32.
- 348 Cunha-Vaz J. Mechanisms of retinal fluid fccumulation and blood retinal barrier breakdown. *Dev Ophthalmol.* 2017;58:11-20.
- 349 Hofman P, Blaauwgeers HG, Tolentino MJ, Adamis AP, NunesCardozo BJ, Vrensen GF, ve ark. VEGF-A induced hyperpermeability of blood retinal barrier endothelium in vivo is predominantly associated with pinocytotic vesicular transport and not withformation of fenestrations. *Vascular endothelial growth factor-A. Curr. Eye Res.* 2000;21:637-645.
- 350 Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Liver Physiol.* 1995;269:467-475.
- 351 Liu D, Xu H, Zhang C, Xie H, Yang Q, Li W, ve ark. Erythropoietin maintains VE-cadherin expression and barrier function in experimental diabetic retinopathy via inhibiting VEGF/VEGFR2/Src signaling pathway. *Life Sci.* 2020;15(259):118273.
- 352 Jeong JH, Nguyen HK, Lee JE, Suh W. Therapeutic effect of apatinib-loaded nanoparticles on diabetes-induced retinal vascular leakage. *J Int J Nanomedicine.* 2016;11:3101-3109.
- 353 Zeng L, Ma W, Shi L, Chen X, Wu R, Zhang Y, ve ark. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticle-mediated interleukin-12 delivery for the treatment of diabetic retinopathy. *Int J Nanomedicine.* 2019;8(14):6357-6369.
- 354 Qiu F, Meng T, Chen Q, Zhou K, Shao Y, Matlock G, ve ark. Fenofibrate-loaded biodegradable nanoparticles for the treatment of experimental diabetic retinopathy and neovascular age-related macular degeneration. *Mol Pharm.* 2019 6;16(5):1958-1970.
- 355 Giusti C, Forte R, Vingolo EM, Gargiulo P. Is acetazolamide effective in the treatment of diabetic macular edema? A pilot study. *Int Ophthalmol.* 2001;24(2):79-88.
- 356 Fishman GA, Gilbert LD, Fiscella RG, Kimura AE, Jampol LM. Acetazolamide for treatment of chronic macular edema in retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 1989 Oct;107(10):1445-1452.

- 357 Vujosevic S, Micera A, Bini S, Berton M, Esposito G, Midenia E. Aqueous humor biomarkers of Muller cell activation in diabetic eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56(6):3913-3918.
- 358 Madonna R, Montebello E, Lazzerini G, Zurro M, De Caterina R. NA⁺/H⁺ exchanger 1- and aquaporin-1-dependent hyperosmolarity changes decrease nitric oxide production and induce VCAM-1 expression in endothelial cells exposed to high glucose. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23(3):755-765.
- 359 Madonna R, Giovannelli G, Confalone P, Renna FV, Geng YJ, De Caterina R. High glucose-induced hyperosmolarity contributes to COX-2 expression and angiogenesis: implications for diabetic retinopathy. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15:18.
- 360 Reber F, Gersch U, Funk RW. Blockers of carbonic anhydrase can cause increase of retinal capillary diameter, decrease of extracellular and increase of intracellular pH in rat retinal organ culture. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2003;241(2):140-148.
- 361 Pickkers P, Hughes AD, Russel FG, Thien T, Smits P. In vivo evidence for K(Ca) channel opening properties of acetazolamide in the human vasculature. *Br J Pharmacol.* 2001;132(2) : 443-450.
- 362 Kehler AK, Holmgaard K, Hessellund A, Aalkjaer C, Bek T. Variable involvement of the perivascular retinal tissue in carbonic anhydrase inhibitor induced relaxation of porcine retinal arterioles in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 ;48(10):4688-4893
- 363 Lu Y, Zhou N, Huang X, Cheng JW, Li FQ, Wei RL, Cai JP. Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats. *Int J Ophthalmol.* 2014;7(1):1-7

8. EKLER

EK-1 Etik Kurul



T.C.S.B
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi
“Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu”
Karar Defteri

Toplantı No: 0039

26.05.2017

PROJENİN ADI (Varsa Kodu): Diyabetik retinopati tedavisinde nanopartiküler karbonik anhidraz İnhibitör etkinliğinin değerlendirilmesi.

SORUMLU ARAŞTIRMACI : Doç.Dr.Nagehan Uğurlu. Araştırma Projesi
T.C.Yıldırım Beyazıt Ün.v.Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilimdalı
(Doç.Dr.Nagehan Uğurlu, Doç.Dr.Murat Demirbilek, Dr.Ebru Erdal, Dr.Ayşe Güzin Taşlıpınar Uzel)

ARAŞTIRMAYI DESTEKLEYEN KURULUŞ(LAR): Y.B.Ünv.BAP projesi

KARAR:

472.Çalışmanın Protokol, usul, yaklaşım ve yöntem yönünden **“ETİK”** değerlendirmesinde **“UYGUN” “OLDUĞUNA”/“OLMADIĞINA” “OYBİRLİĞİ” / “OYÇOKLUĞU”** ile karar verilmiş ve araştırma için belirlenen tüm hayvan, uygulama, tetkik ve girişimlerin bedellerinin araştırma grubunca karşılanması kaydı ile çalışmanın yapılmasına ve Hastanemiz arşiv bilgi ve belgelerinin ve Hayvan Deneyleri Laboratuvarı'nın kullanılmasına **“İZİN” “VERİLMİŞTİR” / “VERİLMEMİŞTİR”**.

Prof.Dr.Uğur KOÇER

Doç.Dr.Kemal KİSİMET
(Raportör)

Ahmet Zeki GÜLER
(Sivil Toplum Örgütü Üyesi)

Doç.Dr.Nezih SUNGUR

Veteriner Hek. Cengiz YALÇIN
(Raportör ve Kurul Sekreteri)

Gülcan BAŞEĞMEZ
(Sivil Üye)

EK-2 Turnitin Dijital Makbuz

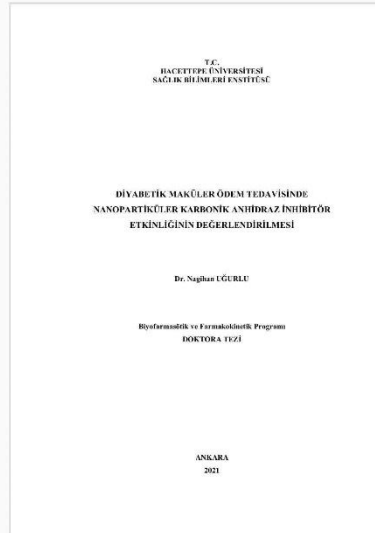


Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Nagihan Uğurlu
Assignment title: DİYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER ...
Submission title: DİYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER ...
File name: LER_KARBON_K_ANH_DRAZ_NH_B_T_R_ETK_NL_N_N_DE_ERLE...
File size: 3.57M
Page count: 169
Word count: 38,317
Character count: 253,030
Submission date: 17-May-2021 08:26AM (UTC+0300)
Submission ID: 1587688467



EK-3 Tez Çalışması Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: DİYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: NAGİHAN UĞURLU

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 169

DİYABETİK MAKÜLER ÖDEM TEDAVİSİNDE NANOPARTİKÜLER KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖR ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIGINALITY REPORT

5% SIMILARITY INDEX	4% INTERNET SOURCES	2% PUBLICATIONS	1% STUDENT PAPERS
-------------------------------	-------------------------------	---------------------------	-----------------------------

PRIMARY SOURCES

1	acikarsiv.ankara.edu.tr Internet Source	1%
2	www.oftalmoloji.org Internet Source	<1%
3	TABAKCI, Burcu Nurözler and ÜNLÜ, Nurten. "Diyabetik Maküla Ödeminde Kortikosteroid Tedavisi", Galenos, 2017. Publication	<1%
4	www.retinaclub.com Internet Source	<1%
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	<1%
6	MASAHİRO TAWADA, SHIN-ICHIRO HAYASHI, YUKA IKEGAME, SHIGERU NAKASHIMA, KAZUHIRO YOSHIDA. "Possible involvement of tumor-producing VEGF-A in the recruitment of lymphatic endothelial progenitor cells from bone marrow", Oncology Reports, 2014 Publication	<1%