

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RETİNA HASTALIKLARI TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
AFLİBERCEPT TEMELLİ NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN IN VITRO İNCELENMESİ

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Ocak, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RETİNA HASTALIKLARI TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
AFLİBERCEPT TEMELLİ NANOTAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN IN VITRO İNCELENMESİ**

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ tarafından hazırlanan tez çalışması 05.10.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya-Metalürji Fakültesi Biyomühendislik Anabilimdalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tülay İREZ, Üye
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Adil Allahverdiyev sorumluluğunda tarafımda hazırlanan 'Retina Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılmak Üzere Aflibercept Temelli Nanoatşıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin In Vitro İncelenmesi' başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2018-3407 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



*Eşime
ve
biricik kızıma*

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi, beceri ve tecrübesini benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e ve çok değerli hocam Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya en derin hislerimle teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Aynı zamanda eğitimim süresince her zaman beni destekleyen Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR'a teşekkürlerimi sunarım. Tezimin değerlendirmesi sürecinde gerek eleştiri, gerekse katkılarıyla bana yardımcı olan çok değerli jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ'e ve Sayın Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tezin deney aşamasında ve yayınlanması sürecinde benden destek, bilgi ve becerilerini esirgemeyen Biyomühendislik bölümü değerli hocalarından Sayın Doç. Dr. Yasemin BUDAMA'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Tezin yapılması sırasında gösterdikleri ilgi ve desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Atıfcan DEMİRCİOĞLU'na, Sahar DİNPARVAR'a ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Doktora eğitimime başladığım ilk günden bu yana omuz omuza ilerlediğim canım arkadaşım Burak ÖZDEMİR'e bana göstermiş olduğu manevi destek, bilgi ve görgü paylaşımı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu tezin başarıyla yerine getirilmesine olanak sağlayan başta Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Biyomühendislik bölüm başkanlığına, bölümümüzün değerli öğretim üyelerine, Fen Bilimleri Enstitüsüne ve FDK-2018-3407 numaralı projesi ile tez çalışmamı desteklediğinden dolayı YTÜ BAP koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bölümümüzün kurucusu Prof. Dr. Mustafa AKDESTE ve bölüm kurucu üyesi Prof. Dr. Huriye KUZU'yu saygıyla anıp, teşekkürlerimi bildiririm. Benden desteğini hiç bir zaman esirgemeyen , her daim yanımda olan ve yolumu aydınlatan biricik annem Huriye Kutlutürk'e, bu yolculuğa benimle başlayan, kimi zaman benimle küçücük bedenine rağmen geç saatlere kadar çalışan, bilimi benim için bir oyun aracına dönüştüren yaşama sevincim canım kızıma varlığı ve olgunluğu için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hayat arkadaşım, sevgili eşim Doç. Dr. Ali KARAGÖZ'e sabrından ve özverisinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	19
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	3
1.3 Hipotez.....	4
2 GÖZ ANATOMİSİ VE FİZYOLOJİSİ	7
2.1 Göz Küresi.....	7
2.2 Göz Küresinin Katmanları.....	8
2.2.1 Sklera ve Kornea (Fibröz Tabaka).....	9
2.2.2 Uvea (Vasküler Tabaka).....	10
2.2.3 Retina (Nöral tabaka).....	11
2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Retina Hastalıklarını Tedavi Amaçlı Vücuda Uygulanış Bölgeleri.....	19
2.4 Göz Hastalıklarının Tedavisi Amaçlı Kullanılan Anti-Vasküler Endotelyal Growth Faktör Molekülleri.....	21
2.4.1 Ranibizumab.....	23
2.4.2 Bevacizumab.....	23
2.4.3 Aflibercept.....	24
2.5 Anti-Vasküler Endotelyal Growth Faktör Moleküllerinin Tedavi Amaçlı	

Kullanıldığı Göz Hastalıkları	25
2.5.1 Diyabetik Retinopati	26
2.5.2 Retinal Ven Tıkanıklığı	35
2.5.3 Senil Makula Dejeneresansı	40
2.6 Nanoteknoloji ve Nantaşıyıcı Sistemler	43
2.7 Nanopartiküller ve Göz Hastalıklarındaki Güncel Kullanımı	46
2.7.1. Göz Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Nanopartikül Tipleri	49
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	64
3.1 Materyal	64
3.1.1 Ekipman	64
3.1.2 Kimyasallar	64
3.2 Deneylerde Kullanılan Besiyerleri, Tampon, Kimyasalların Hazırlanması ..	67
3.2.1 Tamponlar	67
3.2.2 Besiyerleri	67
3.2.3 Nantaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	68
3.3 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemleri	68
3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi SEM (Scanning Electron Microscope)	68
3.3.2 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	68
3.3.3 Zetasizer	69
3.3.4 UV-Vis Spektroskopi	69
3.4 Nanopartiküllerin Hazırlanması	69
3.5 Aflibercept Yüklenmiş PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	70
3.5.1 Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	70
3.5.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	70

3.5.3	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	71
3.6	Deneylerde Kullanılan Hücre Hatları	71
3.6.1	Hücre Kültürü Metotları.....	71
3.6.2	İnsan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) ve Retinal Vasküler Endotelial Hücrelerinin (RVECs) Kültürünün Yapılması	73
3.6.3	İnsan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) ve Retinal Vasküler Endotelial Hücrelerinin (RVECs) Pasajının Yapılması	74
3.6.4	Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu.....	75
3.6.5	RVECs Hücre Kültürünün Optimizasyonu	76
3.7	Hazırlanan Nanopartiküllerin Hücre Hatları Üzerinde MTT Yöntemi ile Toksosite Tayini.....	76
3.8	Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	77
3.8.1	Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi	78
3.9	İn vitro İlaç Salım Çalışmaları.....	79
4	DENEYSEL SONUÇLAR	81
4.1	Aflibercept Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	81
4.1.1	Nanopartikül Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyel Analizi.....	81
4.1.2	SEM Analizi Sonuçları	86
4.1.3	FTIR Analizi.....	87
4.2	İn vitro İlaç Salım Analizleri.....	88
4.3	Boş PLGA ve Aflibercept Yüklü Nanopartiküllerin Her İki Hücre Hattı Üzerindeki Toksikite Profilinin Değerlendirilmesi	89
4.3.1	Hücre Kültürü.....	89
4.3.2	Sitotoksikite Çalışmaları.....	90
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	94
	KAYNAKÇA	100
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	116

SİMGE LİSTESİ

Mw	Ağırlıkça Ortalama Molekül Ağırlığı
dk	Dakika
rpm	Dakika Devir Sayısı
gr	Gram
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilo Volt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetre Kare
mV	Mili Volt
nm	Nano Metre
nM	Nanomolar
cc	Santimetre Küp
cm	Santimetre
cm ²	Santimetre Kare
°C	Santigrat
U/ml	Ünite/ Mililitre
□	Zeta Potansiyel

KISALTMA LİSTESİ

ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ADVANCE	Action in Diabetes and Vascular Disease
ANTI-VEGF	Anti Vasküler Endotelyal Growth Faktör
APS	Anti-Fosfolipit Sendrom
ARPE-19	Human Retinal Pigment Epitel Hücresi
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DCM	Diklorometan
DL	İlaç Yükleme Kapasitesi
DLS	Dynamic Light Scattering
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-High	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose
DMEM -F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12
DMÖ	Diyabetik Makuler Ödem
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DRCR.net	Diabetic Retinopathy Clinical Research Network
DRP	Diyabetik Retinopati
DRS	Diabetic Retinopathy Study
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
ETDRS	Treatment Diabetic Retinopathy Study
FBS	Fetal Bovine Serum
FFA	Fundus Fluresein Anjiografi
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
FDA	Food and Drug Administration
HRECs	Human Retinal Vascular Endothelial Cell
HRVT	Hemiretinal Ven Tıkanıklığı

IVTA	İntravitreal Triamsinolon
IC50	İnhibitor Konsantrasyon
KOH	Potasyum Hidroksit
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Fosfat
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum Fosfat
LCST	Alt Kritik Çözelti Sıcaklığı
LFK	Laser Fotokoagülasyon
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium Bromid Tuzu
NaCl	Sodyum Klorür
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Mono Hidrat
NLC	Nanoyapıda Lipid Taşıyıcılar
Np	Nanopartikül
OKT	Optik Kohorens Görüntüleme
PAMAM	Poliamidoamin
PDGF-B	Platelet Derived Growth Faktor-B
PEG	Polietilen Glikol
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PHB	Poli β-hidroksibutirat
PIGF	Plesental Büyüme Faktörü
PLA	Polilaktik Asit
PLGA	Poli laktik-ko-glikolik Asit
PMMA	Poli(metil metakrilat)
PVA	Polivinil Alkol
RPE	Retina Pigment Epiteli
RVDT	Retinal Ven Dal Tıkanıklığı

RVECs	Retinal Vasküler Endotelyal Hücreleri
RVT	Retina Ven tıkanıklığı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SDF-1	Stromal-Derived Faktor-1
SLN	Solid Lipid Nanopartikül
SMD	Senil Makula Dejeneresansı
SRVT	Santral Retinal Ven Tıkanıklığı
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotelyal Growth Faktör
VEGFR-1	Endotelyal Growth Faktör Reseptör-1
VHAM-1	Vasküler Hücre Adezyon molekülü-1
Z-Ave	Z-ortalaması

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Göz küresi ve Boşlukları [13].....	8
Şekil 2.2	Retina Katmanları [13].....	12
Şekil 2.3	Makuler Anatomi , Optik Disk ve Retinal Besleyici Damarların Görünümü [17].....	17
Şekil 2.4	Retinal Hastalıkların Tedavisi Amaçlı ilaç Uygulama Yolları [18].....	20
Şekil 2.5	Humanize Rekombinant Bir Füzyon Protein Olan Afliberceptin Şematik Yapısı [40].....	25
Şekil 2.6	Diyabetik Retinopati Bulguları İçeren Fundus Fotoğraflaması (A) ve Fluoresein Anjiyografik (FFA) Görüntü (B) [51].....	29
Şekil 2.7	Santral Retinal Ven Tıkanıklığına Bağlı Periferik İskemik Alanların FFA Görüntüsü[120].....	38
Şekil 2.8	Retinal Ven Tıkanıklığına Bağlı Makuler Ödem Bulgularının OKT ile Gösterimi [120].....	39
Şekil 2.9	A. Erken Evre SMD ve Fundus Fotoğrafı, Optik Kohorens Görüntüleme Drusen Varlığı, B. Her Üç Görüntüleme Tekniğinde de Neovasküler Makula Dejenerasyonu Bulguları[133].....	42
Şekil 2.10	Nanotaşıyıcı Sistemler ve Şematik Görünümü [141].....	46
Şekil 2.11	Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılan Nanopartikül Tipleri [18].....	49
Şekil 2.12	Sentez Sonrası Polimerik Nanopartiküllerin Şematik Görünümü[146].....	50
Şekil 2.13	Polimerik Yapıdaki Nanopartiküller İlaç Nanopartiküllere Hapsedilir ya da Yüzeylerine Adsorbe Edilir [148].....	51

Şekil 2.14 Laktik Asit, Glikolik Asit ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'nın Kimyasal Yapıları [152].....	53
Şekil 2.15 Dış Etken Uyarısı Sonrası Polimerik Nanopartiküllerden İlaç Salımı[153]	54
Şekil 2.16 Lipzom Nanopartiküllerin Şematik Görünümü [155].....	55
Şekil 2.17 Dendimer Nanopartiküllerin Şematik Görünümü [159]	56
Şekil 2.18 Tekli Emülsiyon Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Polimerik Nanopartikül Üretimi [165].....	58
Şekil 2.19 İkili Emülsiyon Yöntemi ile Nanopartikül Üretimi [165].....	59
Şekil 2.20 Tuzla Çöktürme Yöntemi [170].....	59
Şekil 2.21 Diyaliz Yöntemi ile Polimerik Nanopartikül Oluşumunun Şematik Olarak Gösterimi [172].....	60
Şekil 2.22 Polimerik Nanopartiküllerin Yığın Erezyonu ve Yüzey Erezyonu Şeklinde Bozulması [178]	62
Şekil 2.23 PLGA Polimerik Nanopartiküllerin Bozunma ve İlaç Salım Aşamaları[175]	62
Şekil 3.1 Thoma Lamı Üzerindeki Çizgiler.....	73
Şekil 3.2 Kriyobank Sonrası Hücrelerin Kültürünün Yapılması (X10).....	73
Şekil 3.3 ARPE-19 Hücrelerin Ekim Sonrası İverted Mikroskopta Görünümü (x10)	74
Şekil 3.4 RVECs Hücrelerinin Ekim Sonrası İverted Mikroskopta Görünümü (x10)	74
Şekil 3.5 ARPE-19 Hücrelerinin Pasajlama Öncesi Mikroskopik Görüntüsü (X10).....	75
Şekil 3.6 RVECs Hücrelerinin Pasajlama Öncesi Mikroskopik Görüntüsü (X10).....	75
Şekil 3.7 Değişik Konsantrasyonlarda MTT Testi	77

Şekil 3.8	Aflibercept Kalibrasyon Eğrisi	79
Şekil 3.9	Diyaliz Kapsül İçine Yerleştirilen Nanopartiküllerin Salım Aşamasındaki Görüntüsü	80
Şekil 4.1	Boş PLGA Nanopartikül Boyut Analiz Sonuçları.....	83
Şekil 4.2	PLGA-Aflibercept Nanopartiküllerinin Boyut Analizi.....	84
Şekil 4.3	Boş PLGA Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafiği	85
Şekil 4.4	Aflibercept Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Grafiği.....	85
Şekil 4.5	(a) Aflibercept Yüklü PLGA Nanopartikülleri SEM Görüntüleri (20.000 Büyütmede) (b) Liyofilizasyon Sonrası Agglomerasyon ve Yapısal Değişiklikler	86
Şekil 4.6	Aflibercept Yüklü PLGA Nanopartiküllerin FTIR Analizi.....	87
Şekil 4.7	Kümülatif İlaç Salım Profili	88
Şekil 4.8	Kültürü Yapılmış ARPE-19 (a) Hücre Hattı İzlenmekte.....	89
Şekil 4.8	Kültürü Yapılmış RVECs (b) Hücre Hattı İzlenmekte	90
Şekil 4.9	48 Saatlik İnkübasyon Sonrası HRECs Hücre Hattı Üzerine Aflibercept Yüklü-PLGA ve Boş-PLGA Nanopartiküllerin Etkisi.....	91
Şekil 4.10	48 Saatlik İnkübasyon Sonrası ARPE-19 Hücre Hattı Üzerine Aflibercept Yüklü-PLGA ve Boş-PLGA Nanopartiküllerin Etkisi.....	92
Şekil 4.11	Boş ve Dolu (Aflibercept Yüklü PLGA) Nanopartiküllerin 72. Saatte HRECs Hücreleri Hattı Üzerine Etkisi.....	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Göz Hastalıkları Tedavisinde Kullanılan Üç Anti-VEGF Ajan Özellikleri [39]	24
Tablo 2.2 Retinal Ven Tıkanıklığı Risk Faktörleri... ..	36
Table 4.1 Partikül Karakterizasyonu, Mean Value \pm SD	82



Retina Hastalıkları Tedavisinde Kullanılmak Üzere Aflibercept Temelli Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin In Vitro İncelenmesi

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Senil makula dejeneresansı, diyabetik retinopati ve retinal ven tıkanıklığı ciddi görme azlığına sebep olan dünyanın ve ülkemizin önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Günümüzde retina hastalıklarının tedavisinde Aflibercept molekülü sıklıkla intravitreal enjeksiyon şeklinde kullanılmaktadır. Tedavinin temel prensibini retina hastalıklarında ortaya çıkan yeni damar oluşumunu önlemek oluşturmaktadır.

Göz içi anti-VEGF uygulamalarının en büyük dezavantajı, etki sürelerinin sınırlı olması ve tekrarlayan göz içi enjeksiyonlar gerektirmeleridir. Bu nedenle enjeksiyonlar arasındaki süreyi uzatacak, uygulanan enjeksiyon sayısını azaltacak yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Son yıllarda nanoteknolojik gelişmeler, yeni nano ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olanak tanımıştır. Göz hastalıklarının tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması amaçlı polimerik nanopartiküller ve sıklıkla poli laktik-koglikolik asit (PLGA) polimeri tercih edilmektedir. Çalışmamıza kadar PLGA'nın Aflibercept kapsülasyonuna ve insan retina vasküler endotelial hücre hattı

üzerinde Aflibercept-PLGA polimerik nanopartikülün etkinliğinin öğrenilmesi yönelik herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bu nedenle bu tez çalışmasının amacı, gözün neovasküler hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere Aflibercept yüklü PLGA nanoformülasyonun geliştirilmesi ve etkinliğinin insan retina pigment epitel (ARPE-19) ve insan retina vasküler endotelyal (RVECs/HRECs) hücre hatları üzerinde in vitro incelenmesi olmuştur.

Deneyler PLGA-Aflibercept nanoformülasyonunun geliştirilmesi ve karakterizasyonu ile etkinliğinin hücre kültüründe incelenmesi şeklinde iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Yapılan taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizlerinde Aflibercept yüklü-PLGA nanopartiküllerinin yuvarlak yapıda ve düzgün yüzeyli olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin zeta analizinde ortalama çapın 262 ± 6.6 mV, polidispersite index (Pdl) 'nin 0.12 ± 0.016 ve zeta potansiyelinin ise $+6.27 \pm 4$ mV olduğu tespit edilmiştir. İkili emülsiyon buharlaştırma yöntemi ile gerçekleştirilen sentez reaksiyonlarının ortalama enkapsülasyon etkinliği 85.2 ± 1.08 % ve ilaç yükleme kapasitesi 10.4 ± 4.5 % olarak saptanmıştır. Yapılan fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi ile enkapsülasyon doğrulanmıştır. İlaç salım süresinin yaklaşık 48 saat olduğu tespit edilmiştir. Geliştirilen yeni Aflibercept-PLGA polimerik nanoformülasyonunun ARPE-19 ve RVECs/HRECs hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir.

Aflibercept-PLGA nanoformülasyonunun in vivo olarak incelenmesi gelecekte neovasküler göz hastalıklarının tedavisini optimize edilmesine imkan sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler : Anti -VEGF, nanotaşıyıcı, nanopartikül, retina

In Vitro Investigation of The Effectiveness of Aflibercept Based Nanocarrier Systems For The Treatment of Retinal Diseases

Işıl KUTLUTÜRK KARAGÖZ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Advisor: Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Senile macular degeneration, diabetic retinopathy and retinal venous occlusion cause severe vision loss and currently Aflibercept administered as intravitreal injections are most commonly used for the treatment of these retinal disorders. The basic principle of the treatment is to prevent the formation of new vessels in retinal tissue.

Major clinical drawbacks of this treatment include short duration of action and repeated intraocular injections. Thus, it is important to produce new drug delivery modalities.

Developments in nanotechnology have enabled the development of new nano drug delivery systems. For the treatment of eye diseases polymeric nanoparticles, especially polylactic-co-glycolic acid (PLGA) polymer are commonly used. Until our study, we did not find any study on Aflibercept-PLGA nanoformulation and its efficacy on human retinal vascular endothelial cells.

The aim of this thesis was to produce Aflibercept-PLGA nanoformulation and to investigate its in vitro effectiveness on human retina pigment epithelium (ARPE-19) and human retinal vascular endothelial (RVECs/HRECs) cell lines.

The experiments were carried out in two stages: the development and characterization of the nanoformulation and the examination of its efficacy in cell culture.

In the scanning electron microscope (SEM), it was determined that Aflibercept loaded-PLGA nanoparticles have a rounded and smooth surface. The mean particle diameter was 262 ± 6.6 nm, the polydispersity index (PDI) was 0.12 ± 0.016 and the zeta potential was $+ 6.27 \pm 4$ mV. The average encapsulation efficiency and drug loading capacity of the synthesis reactions were determined as $85.2 \pm 1.08\%$ and $10.4 \pm 4.5\%$. The encapsulation was verified with fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis. The drug release time was approximately 48 hours and It has been observed that the Aflibercept-PLGA nanoformulation inhibit the proliferation of cells.

Investigation of the Aflibercept-PLGA nanoformulation in vivo will enable to optimize the treatment of neovascular eye diseases in the future.

Keywords: Anti -VEGF, nanocarrier, nanoparticle, retina

1.1 Literatür Özeti

Vasküler endotelyal growth faktor (VEGF) tüm vücutta olduğu gibi gözün arka segmenti dediğimiz retina ve ilişkili dokulardan da salınan ve yeni damar oluşumunu sağlayan bir sinyal proteindir. VEGF'ün değişik alt tipleri olmakla beraber göz içi dokularda yeni damar oluşumundan sorumlu ana alt tipi VEGF-A dır. VEGF-A dokulardaki etkisini vasküler endotelyal growth faktör reseptör -1 (VEGFR-1) ve vasküler endotelyal growth faktör reseptör -2 (VEGFR-2) olmak üzere iki ayrı reseptör üzerinden göstermektedir. Günümüzde retina hastalıklarında istenmeyen yeni damar oluşumunu önleme ve oluşmuş damarlarda gerileme sağlamak için yapılan uygulamalarda VEGF-A ve reseptörlerini bloke etmek tedavinin temel prensibini oluşturmaktadır [1]. Bu amaçla retina hastalıklarının tedavisinde en sık Bevacizumap (Avastin, Genentech Inc.), Ranibizumab (Lucentis, Genentech Inc.) ve Aflibercept adında üç güncel anti-vasküler endotelyal growth faktor molekülü kullanılmaktadır. İlk iki molekül antikor özelliğinde iken, son molekül olan Aflibercept ise insan kaynaklı modifiye füzyon protein niteliğindedir [2]. En son jenerasyon niteliğinde olan Aflibercept üç ayrı komponentden oluşan bir antikor özelliği göstermektedir. Her bir VEGFR-1 ve VEGFR -2 için ayrı bağlanma noktası içeren iki subüniteli Fab kısmı ile IgG1'in Fc kısmını içeren Fc kısmı bulunmaktadır. Bu üç subünitenin bir araya gelmesi ile oluşan sentetik modifiye antikor ise füzyon protein olarak adlandırılmaktadır. Elde edilen bu antikor VEGF-A'nın her iki reseptörü özelliğini taşıdığı için ortamdaki tüm VEGF moleküllerini bağlama özelliği göstermektedir. Aflibercept, VEGF-A'nın yanında diğer bir istenmeyen damar oluşumundan sorumlu molekül olan VEGF-B ve plesental büyüme faktörü (PIGF)'nü bloke etme özelliği de göstermektedir [3,4].

Aflibercept molekülünün retina hastalıklarında ilk kez kullanımı yaşa bağlı makula dejeneresansı olan vakalarda kullanılması ile başlamıştır ve Amerika Food and

Drug Administration (FDA) onayını 2011 yılında almıştır [2]. Afliberceptin yaşa bağlı makula dejeneresansı nedeniyle ortaya çıkan yeni damarları geriletmediği ve yeni damar oluşumunu önlediği görülmüştür [1]. Olgulara her ay 2 mg olmak üzere ilk 3 ay sabit bir şekilde yükleme dozunda intravitreal enjeksiyonlar yapılmış ve takip eden sürede ise 2 aydan erken olmamak üzere lezyonlarda aktivite görüldüğü zaman intravitreal enjeksiyon tekrarına gidilmiştir [5]. Vakalarda enjeksiyon sayısı sınırlaması olmadığı gibi kaç kez enjeksiyon yapılacağı olgu ve hastalık aktivasyon temelli olarak çoklu enjeksiyonlar şeklinde devam edilebilmektedir. Afliberceptin yaşa bağlı makula dejeneresansı olan olgularda mevcut etkinliğinin görülmesinden sonra diyabetik retinopatiye bağlı gelişen neovaskülarizasyon ve makula ödeminde kullanımı gündeme gelmiş ve yapılan çalışmalarda tek başına ilk tedavi olarak veya diğer anti-VEGF ajanlara karşı direnç gelişmiş vakalarda da etkin olduğu görülmüştür. Takip eden süreçte ise retina ven tıkanıklığına (RVT) bağlı maküler ödem olgularında da kullanılmaya başlanmıştır. Bu üç temel endikasyon dışında literatürde polipoidal koroidal vaskülopatili, üveitli ve miyopik koroid neovaskülarizasyonları gelişen vakalarda, retinitis pigmentosa gibi retinal distrofi kaynaklı maküler ödem olan olgularda da başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür [6-12].

Göz içi Aflibercept enjeksiyonunun en önemli dezavantajı etki süresinin sınırlı olmasıdır. Etkinlik süresi iki aya kadar devam etmekle beraber yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan hastalarda ilk 3 yükleme enjeksiyon dozu gerekliliği bulunmaktadır. Enjeksiyon sayısının artışı işleme bağlı enfeksiyon, retina dekolmanı, vitre içi hemoraji, katarakt, göz içi basıncı artışı gibi göze ait lokal komplikasyon risklerinin artışına neden olduğu gibi hastaların tedavi sürecine katılımını ve takiplere devamlılığı da azaltmaktadır. İki enjeksiyon arasındaki süreyi uzatmak ve total enjeksiyon sayısını azaltmak mevcut ortaya çıkabilecek komplikasyonları azaltacağı gibi hastanın tedavi ve takip sürecine uyumunu arttıracaktır. Tüm bu çalışmalar ışığında ve uygulamaya bağlı riskler göz önüne alındığında, tedaviye yönelik etkinlik süresini uzatmak ve enjeksiyon sayısını azaltmak amacıyla nanopartikül temelli uzun dönem ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı gündeme gelmektedir. Bu araştırma ile beraber, göz içi intravitreal enjeksiyon şeklinde tedavi amaçlı kullanılan Aflibercept molekülünün

nanopartikül şeklinde sentezi gerçekleştirilerek salım etkinliğinin uzun süreli gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Araştırma dahilinde öncelikle PLGA ile kombine Aflibercept nanopartikül sentezi yapılacaktır. Aflibercept nanopartikülünün sentez sonrası boyut, salım gibi karakteristik özellikleri belirlenecektir. Ayrıca hücre kültürü ortamında hücrelerdeki toksisitesi belirlenecektir. Bu çalışmanın sonuçları, senil makula dejeneresansı, diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı ve diğer retina ve inflamatuvar iskemik göz hastalıklarına sahip hastalar için alternatif bir tedavi yolu geliştirilmesinde öncü olacaktır. Bu da bu hastalıkların tedavisinde alışılmışın dışında farklı bakış açıları yakalanmasını sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçları yalnızca tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine hizmet etmesi ile sınırlandırılmamalıdır. Bu araştırma ile birlikte, tedavi amacıyla uygulanan total intravitreal enjeksiyon sayısı azaltılıp, hastalarda işleme bağlı enfeksiyon, retina dekolmanı, vitre içi hemoraji, katarakt, göz içi basıncı artışı gibi göze ait lokal komplikasyonların minimize edilmesine yönelik çalışmalara da katkıda bulunacaktır. Aynı zamanda hiçbir şekilde kontrol altına alınamayan ve agresif seyreden vakalarda uygulanacak vitreoretinal cerrahi sayısı ve komplikasyon sıklığında azalma gibi avantajlar sağlayabilecektir. Böylece, hastanın tedaviye uyumu ve yaşam kalitesi arttırılabilecektir. Sonuç olarak tedavi maliyeti, harcanan zaman ve sağlık personeli ihtiyacı azalıp, mevcut kronik bir hastalığın hastaya, hasta yakınına ve devlete olan gideri minimize edilmiş olacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı ' Retina hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere Alfilbercept temelli nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve etkinliğinin in vitro olarak insan retina pigment epiteli (ARPE-19) ve insan retinal vasküler endotelyal hücre (RVECs/HRECs) hattı üzerinde incelenmesi' dir.

Literatürde senil makula dejeneresansı, diyabetik retinopati ve retinal ven tıkanıklığı tedavisinde kullanılan intravitreal Aflibercept enjeksiyonunun ilgili hastalıkların tedavisinde ve komplikasyonlarını kontrol altına alma konusunda yeterliliği, ilacın etki süresinin kısa ve geçici olmasına bağlı olarak sınırlıdır. Dolayısı ile günümüzün ve geleceğin önemli halk sağlığı problemleri arasında olan bu hastalıkların tedavisi ve komplikasyonlarının önlenmesinde henüz halihazırda bulunan etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu araştırmanın amacı ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olan nanopartikül teknolojisi ile Aflibercept molekülünün uzun salımlı modelinin sentezi, salım profilinin değerlendirilmesi ve hücreler üzerinde olan etkisinin incelenmesi olacaktır. Bu sayede bu proje ile intravitreal uygulanacak olan bir anti-VEGF ajanın nanopartikül şeklinde sentezi ve salım profilinin hücre kültürleri üzerinde incelenmesi mümkün olacaktır. Bu araştırma ile olumlu sonuçlar alınması halinde halihazırda kullanım endikasyonunun olduğu göz hastalıklarında ilacın etki süresinde uzama, buna bağlı olarak hastalık komplikasyon oranlarında azalma, yapılan enjeksiyon sayısında azalma ve hasta uyumunda artış sağlanmış olabilecektir.

1.3 Hipotez

Aflibercept molekülü; senil makula dejeneresansı (SMD), diyabetik retinopati (DRP), retinal ven tıkanıklığı (RVT) gibi bir takım oküler hastalıklarda, değişik oküler uygulamalar şeklinde kullanılmakla beraber, anti-vasküler endotelial growth faktor (anti-VEGF) ajanlarından biri olan Aflibercept molekülünün temel kullanım alanı retina hastalıklarıdır. Retina hastalıklarının tedavisine yönelik olarak, vitreus içine intravitreal enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Bu ilacın kullanılmasındaki ana neden; retinanın beslenme bozukluğu, inflamasyonu veya dejenerasyonu sonucu oluşan istenmeyen yeni damarları ortadan kaldırmak veya oluşumunu engellemektir. Yeni oluşan ve matür olmayıp oldukça zayıf olan bu yeni damarların spontan bir şekilde damar dışına sıvı sızdırma ve kanamaya yatkınlıkları oldukça yüksektir. Ayrıca, oluştukları bölgede damar dışına transuda ve eksüda sızıntısı nedeniyle ödeme, damar duvar bütünlüğü bozulması ile de

kanamaya neden olurlar. Bu yeni damarlar geliştiği alana göre subretinal, intraretinal ve preretinal olmak üzere üç alanda da ödem ve/veya kanamaya neden olabilirler. Sonuç olarak yeni damar oluşumu retinanın görme merkezi olarak tanımladığımız makula bölgesinde gerçekleşir ise kalıcı veya geçici ciddi görme kayıpları ile sonuçlanır. Retinanın diğer bölgelerinde gelişen yeni damarlar ise aynı zamanda retina boyunca ve/veya vitreusa doğru retinada çekintilere, sonuç olarak da traksiyonel retina dekolmanına yol açabilecek proliferatif dokulara da neden olabilir. Ortaya çıkan bu patolojiler sonucu retinada geri dönüşümsüz doku değişikleri ve görme kaybı ortaya çıkabilir.

Göz içi Aflibercept enjeksiyonunun en önemli dezavantajı etki süresinin sınırlı olmasıdır. Etkinlik süresi iki aya kadar devam etmekle beraber, yaşa bağlı makula dejenerasyonu olan hastalarda ilk 3 ay her ay tek doz olmak üzere zorunlu yükleme dozu gerekliliği bulunmaktadır. Başlangıç doyurma dozu sonrası ise birer aylık kontrollerle birlikte her 8 haftada bir tek doz enjeksiyon gerekliliği bulunmaktadır. Göz içi enjeksiyon gerekliliği ve sayısının artışı işleme bağlı enfeksiyon, retina dekolmanı, vitre içi hemoraji, katarakt, göz içi basıncı artışı gibi göze ait lokal komplikasyon risklerinin artışına neden olur. Bunun sonucu olarak hastalar açısından kabusa dönen bir uygulama şeklini alıp, hastaların tedavi sürecine katılımını ve takiplere devamlılığı da azaltmaktadır. İki enjeksiyon arasındaki süreyi uzatmak ve total enjeksiyon sayısını azaltmak mevcut ortaya çıkabilecek komplikasyonları azaltacağı gibi hastanın tedavi ve takip sürecine uyumunu arttıracaktır. Bu amaçla polimerik nanopartikül taşıyıcı sistemler uzun süreli ilaç salım sistemleri olarak gündeme gelmektedir. Ayrıca nanopartiküller hücrelere kolaylıkla ve hızlı bir şekilde ulaşabilmekle birlikte daha uzun süre etkin özelliğe sahiptirler. Literatürde kanser ve enfeksiyon hastalıklarına karşı çeşitli polimer temelli nano taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır fakat oküler hastalıklara karşı geliştirilmiş sınırlı sayıda polimerik nanopartikül taşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Özellikle PLGA oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Polilaktikoglikolik asit (PLGA) FDA onaylı bir molekül olup, biyouyumlu ve biyobozunur yapısı, kontrollü bir şekilde uzun süreli ilaç salımına imkan sağlar. Bu

gibi önemli özellikleri nedeniyle, son yıllarda enfeksiyon hastalıklarına ve kansere karşı kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerden en önemlisi olarak bilinmektedir.

Bu tez araştırması ile öncelikle PLGA-Aflibercept nanopartikül sentezi gerçekleştirilecektir. PLGA-Aflibercept nanopartikülünün partikül karakterizasyon analizleri yapılacaktır. Sentezlenen PLGA-Aflibercept nanopartikülünün prelinik kullanım öncesi etkinliğinin değerlendirilmesi ve bu bağlamda in vitro ortamda ARPE-19 ve RVECs hücre hatları üzerine toksisite testleri değerlendirilecektir.

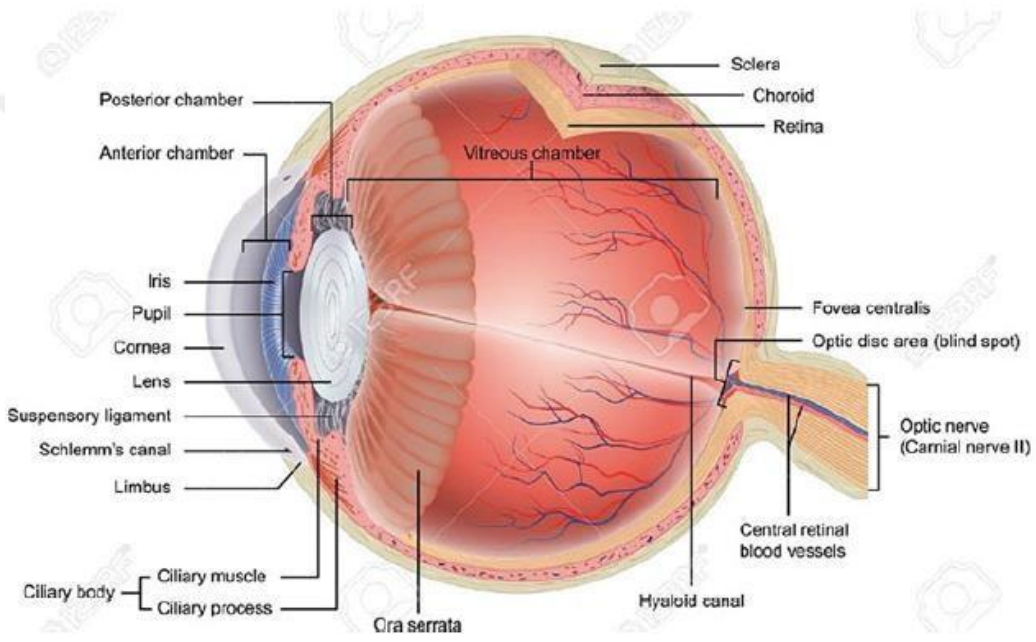
Yapılacak bu araştırma ile, dünyadaki yetişkin çağı körlüklerinin en sık nedeni olan diabetes mellitus ve ikinci en sık görme azlığı nedeni olan retinal ven tıkanıklığı, aynı zamanda yaşlı nüfusun en sık görme azlığı nedeni olan senil makula dejeneresansı ve diğer görme azlıklarına bağlı gelişen komplikasyonların daha uzun süre kontrol altına alınması ve tedavi edilebilir hale getirilebilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca bu araştırmanın, sentezlenen PLGA-Aflibercept nanopartikülünün oluşturulması ile daha uzun süreli göz içi salımının sağlanmasıyla, Afliberceptin etkinlik süresini artırmaya yönelik yapılacak olan sonra ki çalışmalara öncü olması hedeflenmektedir. Böylece iki doz arasındaki etkinlik süresi artışı ile hastalara uygulanan enjeksiyon sayısının azaltılması sağlanmış olabilecektir. Sonuç olarak enjeksiyon sayısındaki azalma ile ortaya çıkabilecek komplikasyon insidansı azalacaktır. Tekrarlı kontrollere gelmek zorunda olan hastalar için tedavi ve takip yükünü ortadan kaldırıp sık enjeksiyon nedeniyle tedaviyi red eden hastaların tedaviye uyumu arttırılabilecektir. Ayrıca komplikasyon insidansının azalması ülke ekonomisine olumlu yönde katkı sağlayacaktır.

2.1 Göz Küresi

Göz ve görme sistemi, insan vücudunun dış dünyaya açılan ve çevrede olup biten en küçük değişikliği bile algılamasını sağlayan yegane sistemlerinden birisidir. İnsanoğlunun toplayıcılıktan yerel tarıma ve hatta av olmaktan avcı olmaya geçişinin izlendiği tarihsel sürece de katkısı yadsınamaz düzeydedir. Bu sistemle ilgilenen tıp bilimine ise ' *Oftalmoloji* ' bilim dalı denilmektedir. Göz, yüzün orbita denilen kemik yapısının içinde yer alan küresel bir organ olup doğumdan ölüme kadar görme işlevinden sorumludur. Göz orbita içerisinde göz küresine hareket fonksiyonunu yaptırtan 6 adet kas dokusu ile çevrelenmiştir. Göz küresini medial, lateral, superior ve inferiora saran adaleler rektus adaleleri olarak adlandırılmaktadır ve her bir adale kendi düzlemi boyunca göze iç, dış, yukarı ve aşağı bakış hareketleri yaptırmaktadır. Diğer iki adale ise inferior ve süper oblik adaleler olup göz küresine torsiyonel hareket yaptırmaktadırlar. Göz küresinin yetişkin bir insandaki ön arka uzunluğu 21-26 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Ortalama hacmi 4,5-5 cc iken ağırlığı yaklaşık 7 gr kadardır.

Bu küresel yapı temel olarak 3 ana boşluk ve 3 ana katmandan oluşmaktadır. (Şekil 2.1). Ana boşluklar ön kamara (camera anterior bulbi), arka kamara (camera posterior bulbi) ve vitreus boşluğundan oluşurken, 3 ana katman ise fibröz , vasküler ve nöral tabakalar şeklindedir. Ön kamara kornea ile lens arasındaki boşluktur. Arka kamara ise daha küçük bir boşluk olup lens ile iris arasındaki mesafedir. Vitreus boşluğu ise en içte gözün nöral tabakası olan retinal doku olmak üzere vasküler ve fibröz tabakalarca çevrelenmiş lensin gerisindeki en geniş göz boşluğudur. Ön ve arka kamara silier cismin pars plikata kısmından salgılanan aköz humor sıvısı ile dolu iken vitreus boşluğu ise göz için amortisör ve darbelere karşı koruyucu bir vazife gören hyaluronik asit, kollajen ve elastinden zengin transparan jelimsi yapıdaki vitreus sıvısı ile doludur. Her iki sıvı da saydam

karakterdedir. Humor aköz sıvısı kısmi olarak göze şeklini vermekten sorumludur ve avasküler karakterde olan lens, korneanın ve gözün anterior bölümünün beslenmesine katkıda bulunur. Sabit bir hızda siliyer cisimden salınarak göz içi basıncın oluşmasını sağlar. Ardından sabit bir hızla da kornea ve iris kökü arasındaki trabeküler ağ ve Schlemm kanalı ile gözü terkeder. Vitreus sıvısı ise embriyolojik gelişim sırasında oluşur, darbe emici özelliğinin yanı sıra göz küresine şeklini verir, göz içi basınca katkıda bulunur, lensi arkadan destekleyerek yerinde kalmasını sağlar ve retinal dokunun koroidal dokuya sıkıca yapışmasına destek te bulunur.



Şekil 2.1 Göz küresi ve boşlukları [13]

2.2 Göz Küresinin Katmanları

Göz küresi fibröz, vasküler ve nöral yapı olmak üzere 3 katmandan oluşmaktadır. Bu üç tabakada en dışardan konjonktival kese ve tenon kılıfı ile sarılıdır. Tenon kılıfının içinde kolayca hareket edebilen göz küresi en dıştan fibröz doku olarak adlandırılan sklera ve kornea ile çevrilidir. Sklera altında vasküler katman olarak

üveal doku ve en iç kısımda vitreus boşluğu ile temasta olan nöral katman yani görme fizyolojisinin gerçekleştiği retinal doku yer almaktadır.

2.2.1 Sklera ve Kornea (Fibröz Tabaka)

Sklera göz küresini oluşturan fibröz tabakanın arka 5/6'lık kısmını oluşturmaktadır. Opak, beyaz renkli bir katman olup rengini yapısını oluşturan dens kollajen ve elastik fibrillerin sıkı ve dağınık diziliminden almaktadır. Esas olarak görece rijid yapısı sayesinde göz küresine şeklini verir, gözün iç yapısını ve içeriğini dışarıdan ayırır ve dış faktörlere maruziyetten korur. Aynı zamanda göze kareket sağlayan rektus ve oblik kasları için tutunma yüzeyi oluşturur [14]. Posterir bölgesinde optik sinirin göz küresinden çıktığı alanda lamina kribrosa adını almaktadır ve incelemek elekli bir yapı haline gelir. Böylece nöral katmandan ayrılan sinir liflerinin göz küresinden çıkarak optik sinir dokusu oluşturmaya aracılık etmiş ve yapısal destek sağlamış olmaktadır. Sklera yapısal olarak düzensiz sıralanmış kollajen liflerin varlığı nedeniyle opak ve rijid bir yapı göstermesine rağmen, düşük moleküler ağırlıklı hidrofilik maddelere karşı kollajen lifler arasındaki porlar sayesinde ve intraselüler olarak geçirgen bir özellik göstermektedir [15].

Göz küresinin ön 1/6'lık kısmını oluşturan fibröz tabaka ise kornea adını almaktadır ve yapıca skleradan farklılık göstermektedir. Kendisini oluşturan kollajen liflerin aynı kalınlıkta olmaları ve düzenli bir yapıda dizilmeleri korneaya skleradan farklı olarak yapıca daha kompakt ve transparan şeffaf bir doku özelliği kazandırır. Bu yapı sayesinde ışığı kıran şeffaf bir mercek özelliğine sahip olmuş olur. Yapısında vasküler ve lenfatik yapı barındırmaz ve beslenmesi göz yaşı ve aköz hümeden sağlanır. Damarsal yapıdan yoksun olmasına rağmen sinirsel yapıdan zengin bir dokudur. Kornea temel olarak 5 katmandan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; Epitel tabakası, Bowman tabakası , Stroma, Descement membranı ve Endotel tabakası olmak üzere. Epitel tabakası 50 -100 µm kalınlığında olup kendi içinde 5 subtabakaya ayrılmaktadır. Hidrofilik ilaçlara karşı %90 bariyer özelliği gösterirken lipofilik ilaçlara karşı %10 luk bir bariyer özelliği göstermektedir [16]. Bowman tabakası ise 8-14 µm kalınlığında daha ince bir yapı

göstermekte olup rejeneratif özelliği bulunmamaktadır. Aynı zamanda ilaçların penetrasyonuna karşı herhangi bir bariyer özelliği göstermemektedir. Stroma ise korneanın en kalın tabakasıdır. Temel olarak %20'si kollagen liflerden, proteinlerden ve mukopolisakkaridlerden oluşmaktadır. Geriye kalan %80 ise su olup bu özelliği nedeniyle epitel tabakasından farklı olarak hidrofilik ilaçlar için bariyer teşkil etmezken lipofilik ilaçlar için bariyer fonksiyonu görmektedir. Bir sonraki tabaka Descement membran tabakası olup yaklaşık 6 µm kalınlığındadır ve ilaç penetrasyonu için herhangi bir engel teşkil etmemektedir. En iç korneal tabaka ise endotel tabakası olup aköz hümörle temas halindedir. Hücreler arasında gap-junctionlar bulunmaktadır ve bu özellik epitel tabakasına göre bu tabakaya 200 kat daha geçirgen bir özellik katmaktadır. Bu tabakadan stromaya geçen sıvı ise bu hücrelerin yüzeyinde bulunan bikarbonat bağımlı Na/K⁺ ATPase pompa aktivitesiyle geriye pompalanmaktadır. Böylece kornea şeffaflığı sağlanmış olur. Ek olarak bu pompa aktivitesi sayesinde kornea boyunca hidrofilik ilaçların absorpsiyonu sağlanmış olur [16].

2.2.2 Uvea (Vasküler Tabaka)

Uveal tabaka kornea gerisinden itibaren sklera ile retina arasında yer alan melaninden zengin vasküler bir ağdan oluşan orta tabakadır. Temel olarak damar, sinir ve bağ doku hücrelerinden oluşmaktadır. Önden arkaya iris, siliyer cisim ve koroidal doku olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Esas olarak oftalmik arterden çıkan ve optik sinir etrafından sklerayı delerek giren kısa siliyer arterler tarafından oluşturulmaktadır. En önde bulunan kısım iris olarak adlandırılır. Ön kamarayı arka kamaradan ayırır, pupillayı oluşturur ve sfinkter özelliği göstererek görme işlevine katkıda bulunur. Ayrıca göze rengini verir. İris kökünden itibaren siliyer cisim kısmı gelmektedir. Pars plana ve pars plikata olmak üzere 2 bölümde incelenir. Pars plikata göz içi basıncını oluşturan aköz hümör denilen sıvının üretimini sağlar. Ayrıca yapısında bulunan siliyar kaslar ve lens ile bağlantıyı sağlayan zonüller aracılığıyla lensin hareketini denetleyerek gözün uzağa ve yakına uyum yapmasını (akomodasyon) sağlar. Pars plana gerisinde ise koroidal doku adını almaktadır. Gözün arka kısmının tamamını kaplar fakat arka kutupta

her bölgede aynı kalınlıkta değildir. Metabolik aktivitesi yüksek makula bölgesinde 0,25 mm kalınlığında iken görme işlevinin daha az fonksiyonel olduğu periferik alanlarda 0,1 mm kalınlığa sahiptir. Bu bölgede damardan zengin yapısı sayesinde gözün ısı dengesini koruyup, retina pigment epitelini ve retinanın dış katlarının beslenmesi sağlamaktadır.

2.2.3 Retina (Nöral tabaka)

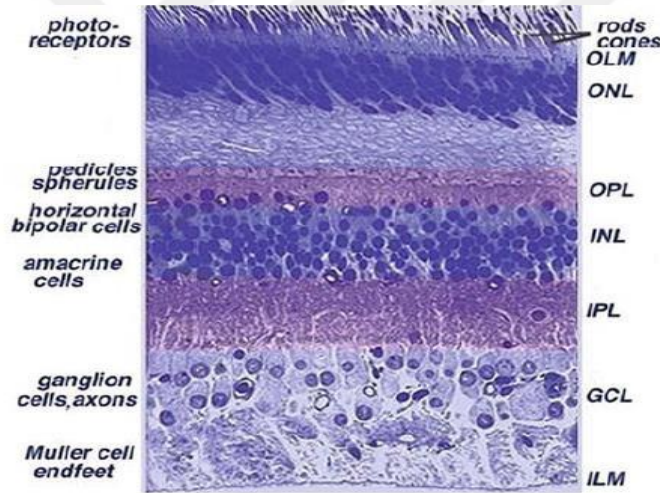
Retina nöroektodermden gelişen ince, transparan bir doku olup göz küresinin posterior bölümünün en iç katmanını oluşturmaktadır. Görmeden sorumlu esas göz katmanıdır. Görme işlevinden sorumlu olan yaklaşık 120 milyon rod ve 6-7 milyon kon fotoreseptör hücreleri ve diğer yardımcı hücrelerden oluşmaktadır. 360 derece olacak şekilde ora serratadan optik diske kadar uzanım gösterir. Retina, vortex venlerinin skleraya giriş yerlerinden itibaren retinal doku ön (anterior) ve arka (posterior) olarak iki bölüme ayrılır. Göz küresini ön ve arka olarak eşit iki parçaya ayıran ekvator ise bu ayrılma noktasının iki disk çapı önünde yer alır. Optik diskten ayrılan damar arkları arasında kalan alan ise arka kutup (makula) olarak adlandırılır. Yaklaşık olarak 6 mm'lik alana denk gelmektedir. Keskin görüş sağlayan merkezi makula bölümüne fovea denilmektedir ve 1.5 mm çapında, optik diskin 3.4 temporalinde 0.8 mm aşağısına yerleşmiştir. Fovea merkezindeki 350 mikron çapındaki merkezi alana ise foveola denilmektedir ve tek sıra kon fotoreseptörlerinin bulunduğu merkezi görme bölgesidir.

Retina en dışta fotoreseptör hücreleri olmak üzere toplamda 9 katmandan oluşan hücresel ve ilişkili yapıların oluşturduğu çok tabakalı bir göz küresi katmanıdır. Fotoreseptör katmanı dışında ise retinal dokunun koroidal dokuya yatışık kalmasını ve aynı zamanda fizyolojik düzeyde kuru kalmasını sağlayan tek sıra retina pigment epiteli hücre katma ile sınırlandırılmıştır.

Nörosensöryel retina tabakaları kendi içerisinde aşağıdaki sıralama şeklinde dıştan içe doğru sıralanır (Şekil 2.2) ;

1. Fotoreseptörlerin iç ve dış segmentlerinin bulunduğu fotoreseptör tabakası,

2. External limitan membran tabakası,
3. Dış nükleer tabaka,
4. Dış pleksiform tabaka,
5. İç nükleer tabaka,
6. İç pleksiform tabaka,
7. Ganglion hücre tabakası,
8. Sinir lifi tabakası,
9. İnternal limitan membran tabakası,



Light micrograph of a vertical section through the human retina.

OLM = Outer limiting membrane (separates inner segments of photoreceptors from their cell nuclei)
 ONL = Outer nuclear layer (cell bodies of the retinal rods and cones.)
 INL = Inner nuclear layer (nuclei of horizontal, bipolar and amacrine cells.)
 IPL = Inner plexiform layer (synapses between ganglion cells and bipolar cells)
 GCL = Ganglion cell layer
 ILM = Inner limiting membrane (boundary between the retina and the vitreous body.)

Şekil 2.2 Retina katmanları [13]

Işık, görme sinyalini (signal transduction) fotoresptör tabakasında oluşturmadan önce içten dışa tüm bu tabakaları geçmek zorundadır. Retinal tabakaları oluşturan hücreler fotoresptörler , horizontal hücreler, bipolar hücreler, amakrin hücreler,

interplexiform hücreler, ganglion hücreleri ve iki çeşit glial hücre (astrozitler ve müler hücreleri)'dir. Retinanın tek bir tabakaya incelendiği foveola bölgesi hariç, nöral retinadaki bu tabakalar içerisinde belirli bir dizilime göre bulunurlar. Bu hücre tabakalarının en dış kısmında ise, melanin pigmentinden zengin ve yüksek oranda melanozom içeren, tek katlı küboidal yapıda olan retina pigment epitelyum (RPE) tabakası ile çevrelenmiştir. Fotoresptör dış segmentine bitişik retina pigment epitel hücrelerinin pek çok önemli fonksiyonu bulunmaktadır.

Bunlar sırasıyla; dış retinal katların beslenmesi amacıyla koroidal dokudan aldığı besinleri difüzyon yolu ile retinaya iletir ve artık maddeleri retinadan tekrar koroidal dokuya taşır, fotoresptör dış segmentlerinin turn overına katkıda bulunur, fototransdüksiyon zincirinde rol alır, dış karetilina bariyerini oluşturur, oküler immün cevapta rol alır, antioksidan aktivite gösterir, melanin granülleri ile ışığın zararlı etkilerinin ve aşırı radyasyonun etkilerini ortadan kaldırır.

RPE hücresi fotoresptör hücrelere bakan tarafında sayısız apikal membran uzantısına sahiptir. Bu uzantıları aracılığı ile dış fotoresptör hücre gövdelerinin mekanik destek sağlar. Fotoresptörlerle RPE arasındaki extraselüler mesafe interfotoresptör matriks olarak adlandırılır ve fotoresptör dış segmentlerine mekanik desteğin sağlanmasına katkıda bulunur. RPE ise kendi bazal membranının da oluşumuna katkıda bulunduğu Bruch membranı üzerine yerleşmiş ve koroidal doku ile bu membran aracılığı ile ayrılmış haldedir.

Retinanın fotoresptör hücreleri adından da anlaşılacağı üzere görme sisteminin ışığı görme sinyaline çeviren duyuşal reseptörleridir. Göze gelen ışığı elektriksel aktiviteye dönüştürerek retinal katmanlar boyunca yorumlanmak üzere beyne iletilmesini sağlarlar. Retinanın ilk 3 tabakasının oluşumundan sorumludurlar. Rod ve kon fotoresptör hücreleri olmak üzere İki çeşit retinal fotoresptör hücresi bulunmaktadır. Her ikisinin de dış limitan membran sınırları dışında yer alan iç ve dış segmentleri vardır. Dış segmentler görme sinyalinin oluşmasını sağlayan pigment moleküllerini içerir. Bu pigment molekülleri ile birlikte sürekli olarak yenilenme özelliği gösteren membranöz disk yapılarını içermektedir. Sirkadiyen ritimle uygun olacak şekilde eski diskler dışarı doğru atılır ve RPE hücrelerinin apikal uzantıları tarafından yakalanarak fagosite edilirler. Böylece RPE hücreleri

tarafından alınan dış segment diskleri yerine yenileri gelir ve disk turnover gerçekleşmiş olur. Rod hücrelerinin dış segmentleri 10 gün içerisinde tamamen yenilenirken kon hücrelerinde bu süre değişkendir. Anatomik olarak, fotoreseptör dış segmenti, mitokondriden zengin dış elipsoid, golgi cisimi ve ribozomdan zengin iç myoid olmak üzere 2 bölüme ayrılır. Bu iki kısım dokuz çift mikrotübül içeren bir silyum ile bağlıdır. İç ve dış segmentlerin birleşim yerlerinin optik kohorens görüntüleme (OKT) bulguları ise ISOS bandı olarak adlandırılır. Daha iç kısımda bulunan fotoreseptör segmentlerini, fotoreseptör nükleusundan ayıran dış limitan membran gerçek bir membran olmayıp, rod, kon ve müller hücre gövdelerinin terminal noktalarının birbirine yapışması sonucu oluşmuş bir yapıdır. Retinanın iç katmanlarında ise farklı tipte hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelerden ilki bipolar hücreler olup fotoreseptör hücreleriyle dış plexiform tabakada ve ganglion hücreleri ile de iç plexiform tabakada bağlantı halindedir. Fotoreseptör hücreler tarafından iletilen görsel sinyalleri amakrin ve ganglion hücrelerine iletirler. Diğer bir hücre tipi olan horizontal hücreler, sinyal düzenlenmesinin sağlayan hücreler olup bipolar hücrelerle ve rod veya kon hücreleri arasındaki görsel uyarının modülasyonundan sorumludur. Amakrin hücreler de horizontal hücreler gibi görsel bilginin işlenmesinde hücreler arası iletişimin modülasyonuna katkıda bulunur. Amakrin ve horizontal hücrelerin yanısıra retinada bir takım glial hücreler de bulunmaktadır. En önemlileri müller hücreleri ve astrositlerdir. Müller hücreleri retinal iskelet yapıyı oluşturan esas hücre olup aynı zamanda fotoreseptör hücrelere mekanik destek sağlayarak retinanın kuru kalmasını sağlayan sıvı emici özellikleri de bulunmaktadır. Retinayı boydan boya katetme özelliği gösterirken vitreus tarafındaki sonlanım noktalarının birleşmesi ile internal limitan membran oluşturmaktadır. Tüm bu hücrelerin hücre gövdeleri ve nükleusları ise iç nükleer tabakayı oluşturmaktadır. Diğer bir grup hücre türü ise interpleksiform hücre grubudur. Bu hücre grubunun hücre gövdeleri de iç nükleer tabakada yer alır. İşlev olarak iç pleksiform tabakadaki amakrin ve bipolar hücreler için postsinaptik, dış pleksiform tabakadaki horizontal ve bipolar hücreler için presinaptik görev üstlenmişlerdir. Böylelikle bu hücre, iç pleksiform tabakadan dış pleksiform tabakaya retina içindeki sinir iletiminin standart yönünün tersine bilgi taşımak gibi eşsiz bir görev üstlenir. Sıradaki retina tabakası olan iç pleksiform tabaka ise

bipolar ve amakrin hücrelerinin ganglion hücre ile yaptıkları sinaps bölgesi tarafından oluşturur. Ganglion hücre tabakası ganglion hücre tarafından oluşturulmaktadır. Bu tabaka kişiler arası farklılık gösterebilmekle beraber yaklaşık 1.2 milyon ganglion hücresi içermektedir. Ganglion hücrelerinin aksonları sinir lifi tabakasını meydana getirmektedir. Ganglion hücre sinir lifi tabakası optik sinire doğru belirli bir anatomik projeksiyonda yönelim gösterir. Optik disk başında sinir liflerinin giriş noktasından itibaren retina 0.4 mm kalınlığında olup perifere doğru gidildikçe incelen bir yapı gösterir ve en ince olduğu bölge ise ora serrata komşuluğunda olup yaklaşık 0.14 mm'dir.

- **Makula Anatomisi**

Retinal bölgeler anatomik ve histolojik olarak ora serrata, periferik ve santral retina olmak üzere 3 bölümde incelenir. Makula santralde yer alırken yaklaşık olarak 6 mm'lik anatomik alana tekabül eder. Histolojik açıdan ise periferik retinaya göre daha çok sayıda ganglion hücre tabakası içermektedir.

Santral retina (makula) topografik incelemede merkezden perifere doğru genişleyen sirküler alanlar olarak 5 bölgede değerlendirilir (Şekil 2.3) ;

1. Umbo
2. Foveola
3. Fovea
4. Parafovea
5. Perifovea

Umbo : Foveolanın santralindeki genişliği tam olarak bilinmeyen en merkezi alandır. Görmenin en keskin olduğu bölgedir. Kon fotoreseptörlerinin en yoğun olduğu alandır. Oftalmoskopik muayenede foveolar refleye tekabül eder.

Foveola : Merkezinde umbonun bulunduğu 350 mikron çaplı, 150 mikron kalınlığında, yalnızca kon fotoreseptörleri ve müller hücrelerinin yer aldığı fovea çukurluğudur. Foveal avasküler zon ile çevrelenir. Bu zon sınırlarında damarlar iç

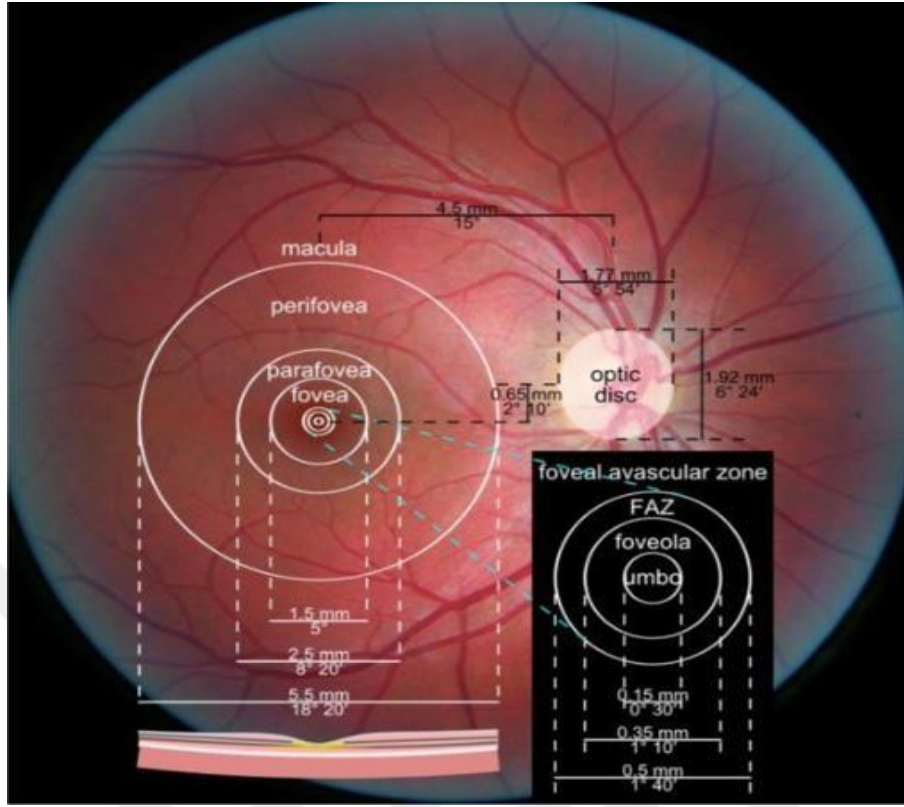
nükleer tabaka seviyesindedir ve yaklaşık olarak 250-600 mikron genişliğine dek uzanım gösterir.

Fovea : En merkezinde umbo ve foveolanın bulunduğu foveal avasküler zonu da içine alan yaklaşık 350-600 mikron genişliğindeki sadece kon fotoreseptörlerinden oluşan merkezi makula bölgesidir.

Parafovea : Foveayı çevreleyen 0.5 mm'lik sirküler alandır. Bu bölgede iç retinal tabakalar normal mimarisine kavuşur.

Perifovea : Parafoveayı çevreleyen 1.5 mm'lik bir alana, fovea merkezinden 2.75 mm uzaklıktaki bir alana tekabül eder. Çok sayıda ganglion hücre tabakası ve 6 bipolar hücre tabakası içerir. Perifoveal tabakada kon hücre aksonları tanjansiyal ve oblik bir gidişat gösterir böylece iç retinada bulunan eksantrik yerleşimli nöronlarla ve Henle'nin sinir lifi tabakasına yönlendirilmiş gangliyon hücreleriyle bağlantı kurabilir.

Makuler alan (posterior pol) klinik olarak değerlendirildiğinde, nöral retinada yaklaşık 1.5 mm'lik merkezi bir sirküler alanı kaplar. Dış kısmındaki en kalın tabaka 0.35 mm olup içeri doğru, foveolada 0.18 mm'ye düşer. Kalınlık olarak en ince olduğu alanda olan merkezi alanda ise konlar yoğunluk kazanır. Dağılım yaklaşık olarak makulada 4000-5000 hücre/ mm² ve foveada 15000 hücre/ mm² sayıda fotoreseptör olacak şekildedir. Rodlar ise fiksasyon noktası olan santral makuladan itibaren 20° lik alandan sonra en yoğun miktarına ulaşır. Her bir foveal kon hücresi maksimum 5 ganglion hücresine kadar sinaps yapabilirken, her bir ganglion hücresi 130 adet farklı fotoreseptör ile sinaps yapabilir. Makuler beslenme santral retinal arter ve dalları tarafından sağlanmaktadır. Arterioller, internal limitan membran altında sinir lifi tabakası içerisinde ilerlerler ve retinanın iç 1/3 lük kısmının beslenmesinden sorumludur. Retinal arteriollerin komşuluğundaki 150 mikrometrelik alan ve foveolanın 400 mikrometrelik alanı içerisinde kapiller beslenme bulunmamaktadır. Fotoreseptörler bu alanda dış retinal beslenmenin kaynağını oluşturan koroidal dokudan RPE'ler aracılığıyla beslenir.



Şekil 2.3 Makuler anatomi , optik disk ve retinal besleyici damarların görünümü

[17]

- **Retinal Kan Dolaşımı**

Retina dokusu temel olarak oftalmik arter tarafından beslenir. Oftalmik arterin bir dalı olan santral retinal arter ve uç dalları retinal iç 1/3 kısımlık katmanların beslenmesinden sorumlu iken, kısa posterior silier arter kaynaklı olan koroidal kan damarları retinanın 2/3' lük dış katmanlarının beslenmesinden sorumludur. Koroidal damarlar beslenmenin ve damarsal dolaşımın büyük çoğunluğunu oluşturur (%65-85) ve özellikle retinanın dış katmanlarının ve fotoreseptörlerin dış pleksiform tabakaya kadar beslenmesinden sorumludur. Koroidal doku kaynaklı beslenme daha çok difüzyon yolu ile gerçekleşmektedir. Geriye kalan %20-30'luk kan akımı ve beslenme ise santral retinal arterler ve dalları tarafından sağlanır. Santral retinal arter uç dalları internal limitan membran altından itibaren sinir lifi

tabakasına girer ve uç dallara ayrılmaya başlar. Temel olarak 3 uç dalı bulunmaktadır.

Bunlar ;

1. Radial peripapiller kapillerler
2. Yüzeysel kapiller katman
3. Derin kapiller katman olmak üzere adlandırılır.

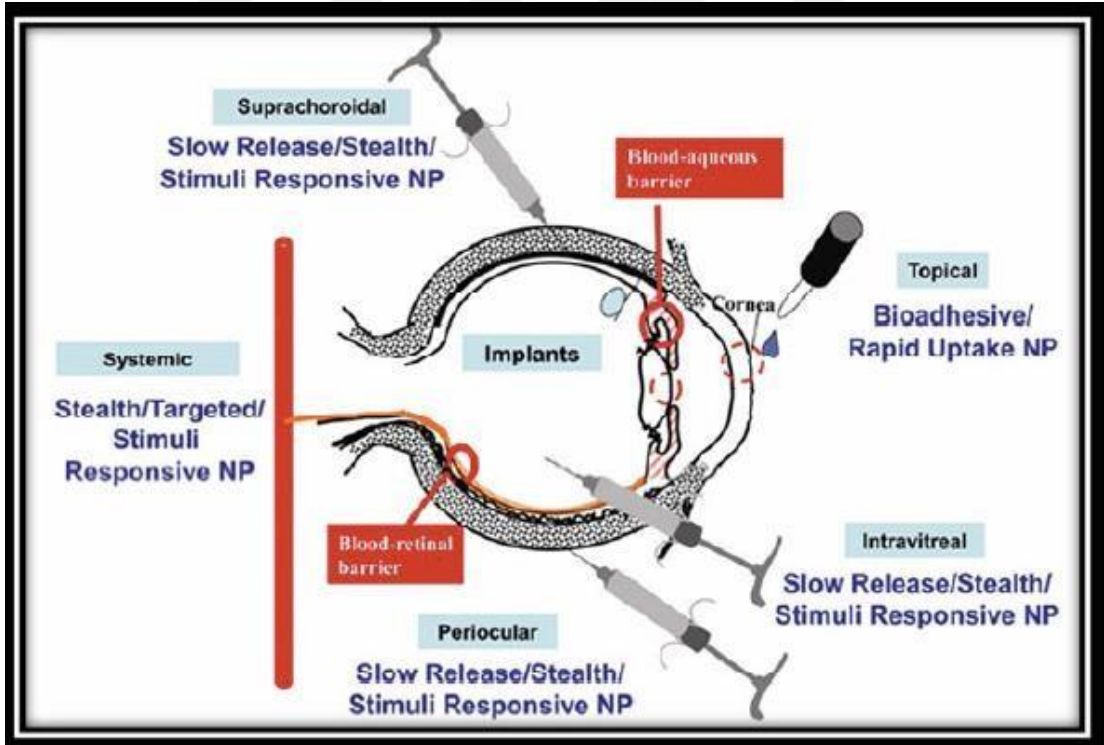
Peripapiller kapillerler dallar retina sinir lifi tabakasının en iç kısmında yer alır ve optik disk başından 4-5 mm'lik bir alanda major süperotemporal ve inferotemporal damar arkları boyunca uzanır. Peripapiller kapiller damarlar birbirleri ile ve diğer yüzeysel ve derin kapiller tabaka damarları ile anastomoz yaparlar. Yüzeysel kapiller katman ganglion hücre tabakası altında uzanım gösterirken, derin kapiller ağ ise iç nükleer tabaka boyunca uzanım göstermektedir. Retina kapillerlerinde endotel düzenli bir dizilim gösterir ve zonula okludens denilen sıkı yapışıklıklarla birbirlerine bağlanarak iç kan-retina bariyerlerini oluştururlar.

Koroidal arterler ise kısa ve uzun posterior silier arter sistemi olarak oftalmik arterden ayrılırlar. Optik disk etrafındaki Zihn halkasını oluşturduktan sonra posterior skleradan girerek koroidal dolaşım sistemini meydana getirirler. Venöz drenaj ise ekvatorun ön kısmına yerleşmiş her bir kadranda 1-2 tane olmak üzere vortex venleri aracılığıyla gerçekleşir. Sklereyi geçerek vönöz drenajı göz dışına sağlayan vortex venleri daha sonra oftalmik vene drene olurlar. Retinanın iç katlarının beslenmesinden sorumlu arteriyel sistemin venöz drenajı ise santral retinal vene olur. Santral retinal vene drenaj öncesi retinal venler retinal arteriyel dağılımı izleyerek santral vene drene olurlar. Arterlerin çaprazladığı bölgelerde aynı adventisyayı paylaşırlar. Santral retinal ven ise santral retinal arterin girdiği yerden optik siniri terk eder. Optik sinir etrafındaki meningial kılıfları geçtiği için, santral retinal ven ve devamlılığı kafa içi basınç artışlarına hassastır. Herhangi bir kafa içi basınç artışı durumunda drenaj yönüne zıt bir yönde dirence maruz kalır ve bu durum papilödem oluşumu ile sonuçlanır.

2.3 İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Retina Hastalıklarını Tedavi Amaçlı Vücuda Uygulanış Bölgeleri

İlaç taşıyıcı sistemleri retina hastalıklarını tedavi amaçlı kullanımda hedeflenen ana tema, uygulanan ilaç molekülünün yeterli miktarda retinal dokuya ulaşmasıdır. Bu amaçla değişik uygulama bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 2.4). Uygulama yollarını lokal ve sistemik olarak iki ana başlıkta değerlendirmek mümkündür. Sistemik uygulama yolları olarak oral (ağızdan) ve intravenöz tedavi uygulamaları bulunurken lokal uygulama yöntemleri olarak direk intraoküler veya perioküler uygulama yöntemleri bulunmaktadır. Her bir uygulama yönteminin kendine ait dezavantajları olmakla beraber esas amaç hedeflenen ilaç miktarının gözün arka segmenti olarak bilinen retina dokusuna ulaşmasıdır. Bu amaçla uygulama yollarında bir takım bariyerlerin geçilmesi uygulama yolları açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Örneğin terapötik ajanın oral yoldan kullanımı gastrointestinal sistemden emilim gerektirdiği için, bu sorun retinal dolaşıma ve retinal dokuya ulaşmadan önce ciddi bir bariyer oluşturmaktadır. Ayrıca hedefe ulaşacak ilaç miktarının daha az olmasına sebep olmaktadır. Diğer bir sistemik uygulama yöntemi olan intravenöz uygulama ise gastrointestinal sistem gibi bir bariyer engelini ortadan kaldırarak terapötik ajanın direkt sadece kan retina bariyer engeli ile karşılaşmasını sağlamaktadır. Fakat bu uygulama yöntemindeki esas sorun ise intravenöz yolla verilen ajanın intravasküler alanda kan içerisinde dilüsyona uğrayarak hedef dokuya daha düşük miktarlarda ulaşmasıdır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için uygulanan yüksek doz ilaç miktarların doza bağımlı sistemik yan etkileri ise diğer bir istenmeyen durumdur. Diğer bir uygulama yöntemi ise topikal uygulamadır. Topikal uygulamada ise aşılması gereken göze ait birden çok anatomik bariyer vardır. Bu uygulama yöntemi ile göze uygulanan terapötik ajanların yalnızca 5%' i gözün arka segmentine ulaşabilmektedir. Bu gibi istenmeyen durumlar nedeniyle retina hastalıklarının tedavisinde daha sıklıkla lokal uygulama yöntemleri tercih edilmektedir. Bunlar perioküler, intravitreal ve suprakoroidal enjeksiyon olmak üzere 3 ana başlıkta incelenmektedir. Perioküler uygulamalar subkonjonktival, subtenon, retrobulber, peribulber ve posterior jukstaskleral yolları içermektedir. Bu uygulama yöntemleri globun dış yüzeyine

terapotik ajanın enjeksiyonunu içermektedir. Böylece skleranın geçirgenliği kullanılarak direk terapötik ajanın transskleral geçiş ile göz içerisine ulaşması ön görülmektedir [18]. Bu yöntemin avantajı sistemik uygulama sırasında görülebilecek olan yan etkilerin daha az miktarda görülüyor olmasıdır. Intravitreal uygulamada terapötik ajanın direkt olarak vitreus içerisine enjeksiyonu söz konusudur ve istenilen dozda hedef dokuya terapötik ajanın ulaştırılması mümkün olmaktadır. Fakat intravitreal enjeksiyonun vitreus içine kanama, retinal sinir dokusunun yerinden ayrışması, enjeksiyon kaynaklı göz içi enfeksiyon (endofthalmitis) ve katarakt gibi istenmeyen etkileri bulunmaktadır [19]. Diğer bir uygulama oldukça yeni bir uygulama yolu olan suprakoroidal enjeksiyon yöntemidir. Bu uygulama yolu ile retinaya ait internal limitan membran ve sklera bariyeri ihmal edilmiş olur. Fakat anatomik olarak suprakoroidal alana ulaşma ve uygulama yapmak cerrahi tecrübe gerektirmektedir. Bu alan potansiyel bir boşluk vazifesi görerek uzun salımlı ilaçlar için ideal bir depolanma alanı olarak görünmektedir [20].



Şekil 2.4 Retinal hastalıkların tedavisi amaçlı ilaç uygulama yolları [18]

2.4 Göz Hastalıklarının Tedavisi Amaçlı Kullanılan Anti-Vasküler Endotelial Growth Faktör Molekülleri

Anjiyogenezis tüm vücutta olduğu gibi oküler dokuların gelişmesinde ve fonksiyon göstermesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Aynı zamanda bir takım göz hastalıklarının patogenezinde de anahtar bir öneme sahiptir. Anjiyogenezis sürecindeki en önemli molekül VEGF olup bu molekülün yanında, plental growth faktor (PIGF), Angiopoetin, Tie reseptörleri, platelet derived growth faktor-B (PDGF-B), stromal-derived faktor-1 (SDF-1), hipoksi-inducible faktor-1 ve ekstraselüler matriks sinyalleri yer almaktadır [21]. Bu süreçte en önemli olan etkileşim VEGF-VEGF reseptör sinyal etkileşimidir [22]. Bu etkileşim hem embriyoda vaskülogenezis hem de yetişkinde anjiyogenezisten sorumlu ana sinyal etkileşimini oluşturmaktadır. Gözde VEGF salınımından sorumlu hücreler başta retinal vasküler endotel hücreleri olmak üzere, perisitler, retinal nöronlar, astrositler, müller hücreleri, retinal pigment epitel hücreleri ve non-pigmente siliyer epitel hücreleridir [23]. Salınımını indükleyen asıl etken ise hipoksidir. Hipoksiye cevaben VEGF salınır ve yeni damar oluşumu ile oksijen fakirliği çeken dokuların oksijenizasyonu sağlanmış olunur. Bunun yanında VEGF inflamasyonu tetikleyerek endotel hücrelerinde vasküler hücre adhesion molekülü 1 (VHAM-1)'in sentezini arttırarak retina-kan bariyerinin yıkılmasına neden olur. Bu durum intravasküler alandaki içeriğin damar dışına sızmasına neden olur ve diyabetes mellitus, retinal ven oklüzyonu ve neovasküler yaşa bağlı makuler dejenerasyon gibi oküler hastalıklardaki retinal ödemin oluşmasına neden olur [24-25]. Hipoksi kaynaklı ortaya çıkan yeni damar oluşumuna neovaskülarizasyon adı verilir ve oküler bir çok hastalığın patogenezinde bulunan bu durum görme azlığına neden olduğu için tedavi gerektirir. Tedavi sürecinin hedefinde ise neovaskülarizasyona neden olan ana molekül VEGF'ün blokajı yer almaktadır. Bu amaçla halihazırda kullanılan bir takım anti-VEGF molekülleri vardır. Bu moleküller Pegaptanib, Bevacizumab, Ranibizumab ve Aflibercept olup klinik uygulamada intravitreal enjeksiyon şeklinde göz hastalıklarını tedavi amaçlı kullanılmaktadırlar (Tablo 2.1). Mevcut ilaçlar halihazırda onkolojik ilaçlar olarak üretilip kullanılmaktadırlar. 2004 yılında Bevacizumab (Avastin; Genentech, San Francisco, California, USA)

FDA tarafından kolorektal kanserlerde kullanılmak amaçlı üretilmiş olup daha sonra meme ve beyin tümörlerinde de kullanım izni almıştır [26]. Takip eden yıllarda Bevacizumab molekülünden Ranibizumab (Lucentis ®, Genentech, South San Francisco, CA, USA/Roche, Basel, Switzerland, distributed outside of North America by Novartis) geliştirilmiştir. 2012 yılında ise Ziv-aflibercept (Zaltrap; Regeneron, Tarrytown, New York, USA) metastatik kolorektal kanserler için geliştirilmiş ve VEGF-Trap-Eye adında göz formülasyonu olarak Aflibercept üretilmiştir [27]. Diğer bir molekül olan Pegaptanib (Macugen®; EyeTech, FL/Pfizer Inc., NY, USA), fragmente RNA aptemeri olup ilk kez 1990 yılında üretilmiştir [28]. Pegaptanib VEGF-165'in vasküler endotel hücrelerdeki reseptörü ile etkileşimini bloke etmektedir. Kullanıma girdiği sürede senil makula hastalığı tedavisinde etkinliği görülmüşken, günümüzde daha yeni olan diğer 3 molekülün etkinliğinin daha üstün olması nedeniyle klinik kullanımı yok denecek kadar azalmıştır.

VEGF-A molekülü hipoksiye cevaben üretilen esas VEGF molekülü olup VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plental growth faktor (PlGF) ile aynı genetik aile tarafından kodlanmaktadır. 6. Kromozoma ait bir gen tarafından kodlanmakta olup VEGF-A'nın 5 temel izoformu bulunmaktadır (VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A189 ve VEGF-A206) [29-31]. Anti-VEGF molekülünde temel hedef VEGF-A'yı ve tüm alt tiplerini bloke etmektir. Pegaptanip ise bu molekülün sadece VEGF-165 subünitini bloke etmektedir. Bu nedenle etkinliği diğer anti-VEGF ajanlarına göre sınırlıdır.

VEGF molekülleri ortamda VEGF dimerleri halinde bulunmaktadır ve her bir VEGF molekülünü bloke etmek için 2 adet anti-VEGF gerekir. Böylece VEGF molekülünün VEGF reseptörüne bağlanması engellenerek neovaskülarizasyon ve makuler ödem önlenmiş olunur. Aflibercept molekülü ise diğer 3 molekülden farklı olarak 2 adet molekül ihtiyacı olmadan tek bir molekül halinde VEGF molekülünü bloke eder.

VEGF reseptörleri endotel hücre yüzeyinde yerleşmişlerdir[31]. VEGF-A molekülü aslında bir tirozin kinaz reseptörü olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 üzerinden etki göstermektedir. VEGFR-2 anjiogenezisden daha belirgin bir şekilde sorumlu iken

VEGF'e olan afinitesi daha düşük olduğundan VEGFR-1 tedavide daha önemli bir hedef haline gelmektedir [32].




2.4.1 Ranibizumab

Ranibizumab molekülü 48 kD ağırlığında fragmente rekombinant Fab molekülü olup monoklonal Bevacizumab molekülünden (Fab 12) elde edilmektedir. İn vitro olarak murine monoklonal antikordardan (mAb A4.6.1) bir seri rekombinant proses sonrası üretilmektedir. Bevacizumab molekülünden daha küçük yapıdadır ve antikorun Fc kısmı bulunmamakla beraber sadece Fab kısmından ibarettir[1]. VEGF-A' nın tüm alt tiplerini bloke etme yeteneğine sahiptir. 0.5 mg/0.05 ml intravitreal enjeksiyon sonrası yapılan hayvan çalışmalarından vitreus yarılanma ömrü 2.84 gün olduğu gösterilmiştir [33]. İnsan vitreusundaki yarı ömrü ile ilgili yapılmış çalışma olmamakla beraber bir takım matematiksel modellemelerle elde edilen sürenin 4.75 gün olduğu bildirilmiştir [34].

2.4.2 Bevacizumab

Bevacizumab rekombinant, humanize monoklonal antikordur. Metastatik kolorektal kanserin tedavisinde kullanılmak üzere üretilmiştir. Üretim tekniğinde 93-95% ml insan antikoruna olan bir antikora monoklonal olarak üretilmiş fare antikorlarının ((mAb)A.4.6.1)) komplementari bölgelerinin transferi gerçekleştirilir. Yeni oluşan antikora ise Fab 12 antikoruna adı verilir [1,35]. VEGF-A nın tüm alt tiplerini bloke etme yeteneğine sahiptir. Fakat retinal hastalıkların tedavisinde hala off-label olarak kullanılmaktadır [36]. Yapılan hayvan çalışmalarında 1.25 mg/0.05 ml intravitreal enjeksiyon sonrası vitreus yarı ömrünün 4.32 gün olduğu gösterilmiştir [37]. Non-kompartmental insan vitreus yarı ömrü değerlendirmesi analizlerinde 1.5 mg intravitreal enjeksiyon sonrası yarılanma ömrünün 9.82 gün olduğu görülmüştür [38].

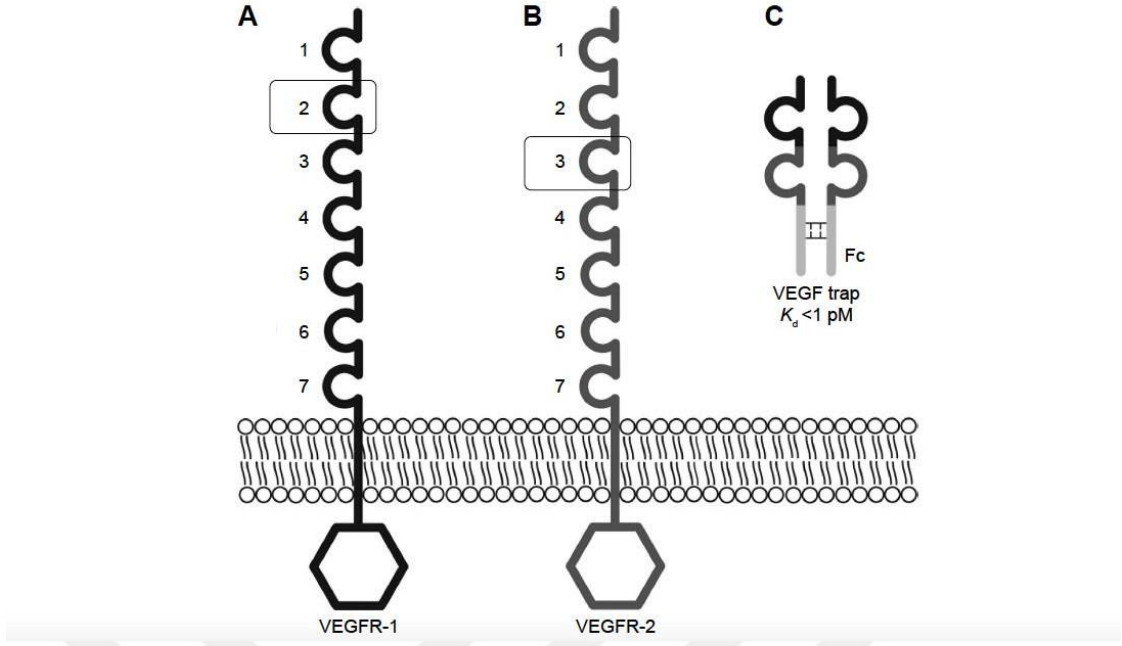
Tablo 2.1 Göz hastalıkları tedavisinde kullanılan üç anti-VEGF ajan özellikleri [39]

Properties			
	Ranibizumab	Bevacizumab	Aflibercept
Class	Antibody fragment	Monoclonal antibody	Fusion protein
MW (KDa)	48	149	115
Net charge	Negative	Negative	Slightly positive
Binding target	VEGF-A	VEGF-A	VEGF-A, VEGF-B, PIGF
K_D for VEGF ₁₆₅ (pM)	46	58	0.49

M_w = molecular weight; K_D = equilibrium dissociation constant.

2.4.3 Aflibercept

Aflibercept molekülü 115 kDa ağırlığında tamamen hümanize rekombinant bir füzyon proteindir. Yapısında VEGFR-1 ve VEGFR-2 yi bağlayan 2. ve 3. domainleri ile IgG'nin Fc kısmın birleşiminden oluşmuştur (Şekil2.5) [40]. Böylece ortamda serbestçe dolaşan VEGF-A'nın tüm türlerini yapısındaki domainler sayesinde bağlayabilme özelliğine sahiptir. Bunun yanında VEGF-B ve PIGF-1 ve 2 yi de bloke etme özelliği de gösterir [41,42]. Yapılan hayvan çalışmalarında 2 mg/ 0.05 ml intravitreal enjeksiyon sonrası yarılanma ömrünün 3.92 gün olduğu görülmüştür [43]. İnsan vitreusundaki yarılanma ömrü bilinmemekle beraber yapılan matematiksel modelleme yöntemine göre elde edilen sonuçta 7.33 gün olduğu gösterilmiştir [34]. Yüzey yükü olarak Bevacizumab ve Ranibizumabdan farklı olarak hafifçe pozitif yüzey yükü özelliğine sahiptir.



Şekil 2.5 Humanize rekombinant bir füzyon protein olan Afiberceptin şematik yapısı [40]

2.5 Anti-Vasküler Endotelial Growth Faktör Moleküllerinin

Tedavi Amaçlı Kullanıldığı Göz Hastalıkları

Retina hastalıkları dünyanın ve ülkemizin ciddi halk sağlığı problemlerinden biridir. Günümüzün ve geleceğin önemli halk sağlığı problemlerinden biri olan retina hastalıklarının tedavisi ve komplikasyonlarının önlenmesinde henüz yeterli bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Tedavi gerektiren göz hastalıkları arasında sıklıkla karşımıza diyabetik retinopati, senil makula dejeneresansı, retinal ven tıkanıklığı ve retinanın diğer inflamatuvar ve iskemik göz hastalıkları çıkmaktadır. Bu hastalıkları tedavi amaçlı intravitreal anti-VEGF ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır [26-28]. Fakat mevcut yöntemlerin kullanıldığı durumlarda bile çeşitli istenmeyen sorunlar ve tam olarak tedavi mümkün olamayabilmektedir. İstenmeyen bu sorunlar arasında özellikle retina dekolmanı (görme sinirinin yerinden ayrışması), enfeksiyon ve göz içi kanama gibi görme kaybına yol açacak

ciddi sorunlar bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda retina hastalıklarının tedavisinde uygulanan intravitreal enjeksiyon sayısını azaltma amaçlı daha uzun etkili ilaç molekülleri veya varolan ilaç moleküllerinin uzun süreli ilaç taşıyıcı sistemler halinde geliştirmeyi amaçlayan yeni çalışmalara literatürde rastlanmaktadır.

2.5.1 Diyabetik Retinopati

Diabetes mellitus (DM) yüksek kan şekeri düzeyi ile giden, yetersiz insülin salgılanması veya insüline karşı dirence bağlı ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Bir çok sistemik komplikasyonları olmakla beraber bunlardan biri olan diyabetik retinopati, DM 'un en sık görülen komplikasyonu olup gelişmekte olan ülkelerde çalışan nüfusta (20-74 yaş) önlenebilir görme azlığının en sık nedenidir[44]. Diyabet prevalansının dünya çapında 2000 yılında 2.8% olduğu ve 2030 yılında ise bu oranın 4.4% olacağı tahmin edilmektedir. Diyabetik kişi sayısının ise 2000 yılında 171 milyondan 2030 yılında 366 milyona çıkabileceği ön görülmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda diyabetik retinopatinin genel bir halk sağlığı problemi olacağı ve artan obez nüfus ile beraber görülme sıklığının artacağı vurgulanmaktadır [45].

Diyabetik retinopati henüz makroskobik retina bulgularının görülmediği dönemlerden itibaren fizyopatolojik olarak birtakım mikrovasküler değişiklikler şeklinde ilerlemektedir. Bu süreçte vasküler yatakta perisit kaybı, bazal membran kalınlaşması ve endotelyal fonksiyon bozukluğu gelişmekle beraber sonuç olarak vasküler bariyer fonksiyonunun bozulması ortaya çıkmaktadır. Bariyer fonksiyonunun bozulması eksüdatif sızıntı kaynaklı ödemele beraber retinal beslenmenin bozulmasına neden olup retinal iskemi ve neovaskülarizasyona yol açarak proliferatif diyabetik retinopati sürecine gidişe neden olmaktadır [46-48]. Mevcut tedavi stratejileri arasında ise laser fotokoagülasyon (LFK), intravitreal triamsinolon (IVTA) enjeksiyonu, intravitreal anti-vasküler endotelyal growth faktor enjeksiyonu ve en son aşamada vitreoretinal cerrahi müdahale bulunmaktadır[49,50]. Fakat bu tedavileri rejimlerinin başarıları sınırlıdır. LFK sonrası tekrar kanama riski ve çoklu LFK gereksinimi, IVTA ve anti-VEGF

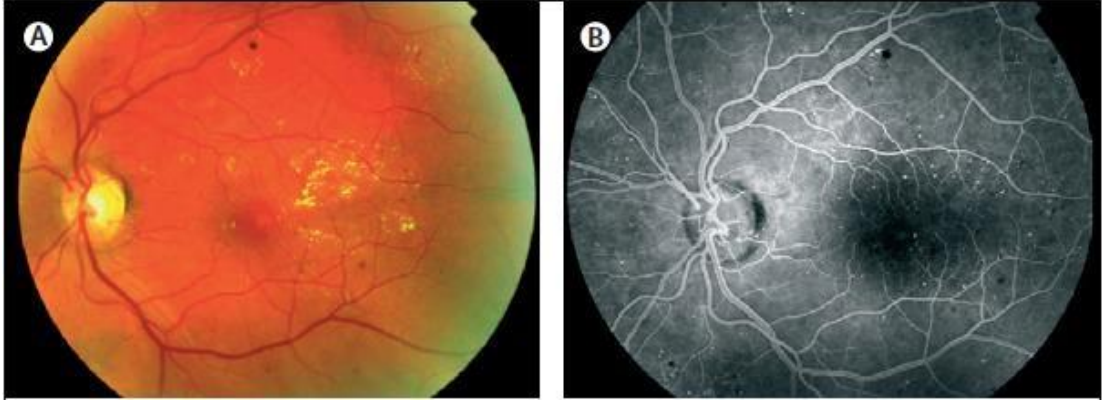
enjeksiyon etkinliklerinin geçici olması söz konusudur. Ayrıca katarakt, glokom ve endoftalmi gibi yan etkilerinin görülmesi ve iskemik sürecin engellenememesine bağlı çoğu hastanın vitreoretinal cerrahi ihtiyacı göstermesi hala ciddi bir sorun teşkil etmektedir.

- **Diyabetik Retinopati Fizyopatolojisi**

Diyabetik retinopati (DR) uzun süreli kontrolsüz diyabetin en sık vasküler komplikasyonu olup risk faktörleri arasında hiperglisemik düzey, hipertansiyon, dislipidemi, diyabetin süresi, etnik köken, gebelik, puberte ve katarakt cerrahisi yer almaktadır. Diyabetik retinopati vasküler düzeyi ilgilendiren bir hastalık olup fizyopatolojik sürecin merkezinde perisit ve endotelial hücre kaybı gerçekleştiği için iç retinal mikrovasküler yatağın endotelial hücre kaybı olarak da adlandırılabilir [51]. Aynı zamanda endotel ve perisit hücrelerinin oturduğu bazal membranda kalınlaşma ile birlikte vasküler düz kasta disfonksiyon da görülmektedir [52]. Vasküler yapıda meydana gelen bu değişikliklerin temel nedeni hiperglisemi ile beraber ortaya çıkan oksidatif stres, inflamasyon, protein kinaz C ve renin anjiyotensin sistemi aktivasyonu ve neticede ortamda artan vasküler endotelial growth faktör düzeyidir [53]. Vasküler yapıdaki bozulma takipeden süreçte eksüdatif materyalin damar dışına sızmasına neden olup retinanın makula bölgesinin etkilenmesi ile görme azalması ile sonuçlanır. Ortaya çıkan bu görme azalmasına retinal nöral hücrelerinin etkilenmesi ve bu hücrelerde oluşan dejenerasyon ve disfonksiyon da katkıda bulunur [47,48]. Metabolik disregülasyon sonucu gerçekleşen mikrovasküler yapıdaki bu bozulma ilerleyen aşamalarda vasküler endotelial hücrelerde aberan proliferasyonla sonuçlanır. Bu süreçte kabul gören en önemli teori bu sonucun perisit kaybı kaynaklı olduğu görüşüdür. Perisit hücreleri vasküler endotelial hücreler ile aynı bazal membran üzerine oturmuş, vasküler düz kas hücre bağlantılı perivasküler hücreler olup endotel hücre hayatı için gereklidir. Endotelial hücrelerin beslenmesine katkıda bulunarak anti-inflamatuar ve anti-anjiyogenik bir faaliyet göstermektedir. Aynı zamanda endotel hücreleri ile bağlantıları sayesinde kan-retina bariyerine katkıda bulunur [52][54]. Diyabetik süreçte retinal kapiller hücreler sürekli olarak hasar

altında olup bu maruziyete cevaben devamlı bir turnover halinde yenilenmektedirler. Endotel hücrelerinin sahip olduğu bu replikatif kapasitenin bir sınırı olup bu sınıra Hayflick limit denilmektedir ve bu kapasite diyabetik kişilerde normal bireylere nazaran daha sınırlıdır [55]. Diyabetik bireylerde azalmış endotel hücre yenilenme kapasitesi, perisit hücre hasarı ve hücrelerin yerleştiği bazal membran hasarı diyabetik retinopatideki metabolik stres sonucu oluşan vasküler hasar mekanizmasında anahtar rol oynamaktadır.

Vasküler yapıda meydana gelen bu değişiklik kendini klinik muayenede en erken seviyede mikroanevrizma şeklinde gösterir. Diyabetik kontrol sağlanmazsa vasküler yapıdaki bozukluk ilerler ve var olan mikroanevrizmalara kanama, sert eksuda (lipit depositleri), cottonwool spotlar (ganlion hücre aksonlarında aksoplazmik debris akümüasyonu), venöz dilatasyon, boncuklanma ve intraretinal mikrovasküler anormallikler (dilate kapillerler) eşlik eder. Bu aşamaya non-proliferatif diyabetik retinopati evresi denilmekle beraber en son aşamada vasküler yapıdaki bozukluk kaynaklı retinal beslenme gerçekleşemez ve iskemi sonucu retinal neovaskülarizasyon gerçekleşir. Böylece diyabetik retinopati nonproliferatif evreden proliferatif evreye geçer. Bu evrede ise retinada ve optik disk başında kolayca kanayabilen yaygın neovaskülarizasyon odakları görülür. Bu odaklar retina içine kanayabileceği gibi vitreus içine de kanama gösterebilir. ilerleyen aşamalarda ise bu neovasküler odaklardan fibrovasküler proliferasyonlar gelişip total retina dekolmanına dek gidebilecek traksiyonel retina dekolmanları gerçekleşir. Diyabetik retinopati evrelerindeki bu ilerleme gerçekleşirken retinopatinin hangi evrede olduğundan bağımsız olarak vasküler yapıdaki değişiklikler kaynaklı makulada ödem gerçekleşebilir. Bu klinik tablo diyabetik retinopatideki en sık görme azlığı nedenidir.



Şekil 2.6 Diyabetik retinopati bulguları
içeren fundus fotoğraflaması
(A) [51]

Şekil 2.6 Fluoresein anjiyografik (FFA)
görüntü (B) [51]

• **Diyabetik Retinopati Tedavisi**

Diyabetik retinopatinin tedavisinde zaman içerisinde yol kaydedilebilmesine rağmen diyabetik retinopati sonucu görme kaybı hala yetişkin çağın en sık görme kaybı nedeni olarak devam etmektedir. Güncel tedavi rejimleri fizyopatolojide anahtar rol oynayan perisit ve endotel hücre fonksiyonları iyileştirme yönünde olmakla beraber diyabetik retinopati tedavisini sistemik tedaviler ve lokal oküler tedaviler şeklinde iki ana başlık altında toplayabiliriz.

Sistemik tedavi olarak sıkı kan şekeri ve tansiyon kontrolü iki ana tedavi şeklini oluşturmaktadır. Daha önce yapılmış iki önemli çalışma DCCT ve United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) sıkı kan şekeri kontrolünün (ml, HbA_{1c},7 %) diyabetik retinopati gelişmedeki ve ilerlemedeki riski azalttığını göstermiş olup HbA_{1c} düzeyindeki her yüzde düşüşü retinopati gelişme riskini 30-40 % düşürmekte olduğunu vurgulamaktadır. Diğer bir çalışma olan Action in Diabetes and Vascular Disease (ADVANCE) çalışmasında ise agresif glisemik kontrolün (HbA_{1c} <6.5%) diyabetik retinopati ilerlemede doğru orantılı bir şekilde etkin olmadığı vurgulanmıştır. The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) çalışmasında ise agresif glisemik kontrolün mortalite ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır [50][56,57]. Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar diğer bir

sistemik risk faktörü olan hipertansiyonun diyabetik retinopati gelişimi için modifiye dileyebilir bir risk faktörü olduğunu vurgulamaktadırlar. Sistemik sistolik kan basıncındaki her 10 mmHg lik artışın erken dönem diyabetik retinopati gelişimini 10% ve ileri derecede proliferatif diyabetik retinopati gelişimini 15% arttırdığını vurgulamışlardır [50][58,59]. UKPDS çalışmasında ise sıkı kan basıncı kontrolünün retinopati progresyonunu 3 kat, görme kaybını 2 kat ve laser tedavisi ihtiyacını Tip 2 DR de 3 kat azalttığı görülmüştür[50]. DR progresyonunda diğer bir risk faktörü dislipideminin ise Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) çalışmasında trigliserit yüksekliği ile doğru HDL yüksekliği ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir [60].

DR'nin tedavisinde mevcut güncel lokal tedaviler arasında laser fotokoagülasyon, intravitreal triamsinolon enjeksiyonu (IVTA), intravitreal ant-VEGF ajanlar, intravitreal steroid implantlar yer almaktadır. Bunun yanında yeni tedavi yöntemleri olarak nanotıp, kök hücre ve diğer sistemik tedavi yöntemleri de yer almaktadır.

- **Laser Fotokoagülasyon**

Laser tedavisi DR'nin tedavisinde var olan görme düzeyini korumada hala ana tedavi şekli olmakla birlikte geri dönüşsüz doku harabiyeti en önemli yan etkisi olarak görülmektedir. DR tedavisinde iki tip laser tedavi şekli kullanılmaktadır. Proliferatif tip diyabetik retinopatide panretinal laser fotokoagülasyon tercih edilirken maküler ödem tedavisinde (fokla veya grid laser) ve fokal iskemik retina odaklarında fokal laser fotokoagülasyon daha çok tercih edilmektedir. Laser tedavisindeki temel amaç beslenmesi bozuk retina alanını laser ile tamamen yakıp bu alandan ortama yeni damar (neovaskülarizasyon) oluşumuna neden olan VEGF gibi mediatörlerin salınımını engellemektir [61]. Diabetic Retinopathy Study (DRS) 92 ve Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) 91 çalışmalarında laser fotokoagülasyon DR'nin tedavisinde ana tedavi yöntemi olarak vurgulanmıştır [62][63]. DRS çalışmasının sonuçlarında panretinal fotokoagülasyonun proliferatif DR'de görme düzeyini düşme riskini 5 yıl içerisinde 50% azalttığını ve ETDRS çalışmasına göre daha az düzeyde şiddetli DR' nin ileri düzey DR'ye gitme riskini

yarıya indirdiği sonucuna ulaşılmıştır. Aynı zamanda ETDRS çalışmasının sonuçlarına göre maküler fokal laser fotokoagülasyonun klinik anlamlı makula ödemi kaynaklı orta düzeyde görme düzeyi kaybı riskini yarıya indirdiği görülmüş olup Diabetic Retinopathy Clinical Research Network (DRCR.net) maküler laser yapılan hastaların 2 yıl sonunda görme düzeylerinin yaklaşık 30% iyileştiği (≥ 10 harf) sonucuna ulaşılmıştır [62-64]. Laser fotokoagülasyonun görme düzeyi üzerine olan bu etkiler yanında bir takım oküler yan etkileride bulunmaktadır bu yan etkiler; karanlık adaptasyonunda bozulma (25%), görme düzeyine minimal düzeyde azalma (10%), periferik görme alanı kaybı (5%), gece görme azalması ve renkli görmenin bozulması ile birlikte maküler ödemde artış gibi [50][51]. Bu gibi yan etkileri nedeniyle laser fotokoagülasyona alternatif tedavi yöntemleri arayışı laser fotokoagülasyonu etkin bir şekilde kullanmanın yanında devam etmektedir.

- **Antivasküler Endotelyal Growth Faktör Ajanlar**

DR sırasında gerçekleşen hipoksi nedeniyle gerçekleşen vasküler değişiklikler retinal endotelyal hücreler, perisitler ve retina pigment epiteli tarafından VEGF salınmasına neden olur. Ortamda artan VEGF anjiyogenezisi stimüle ederek yapıcı zayıf yeni damar oluşumu (neovaskülarizasyon) ile sonuçlanır. Zayıf karakterdeki bu yeni kapiller ağ yüksek derecede geçirgen olup retina dokusu içerisine sıvı (eksuda) sızmasına neden olarak retina ödemi gelişmesine yol açar [65]. Bu mekanizmayı bloke etmek için anti-vasküler endotelyal growth faktor ajanları geliştirilmiş olup hem retinal iskemi hemde retinal ödemi ortadan kaldırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla hali hazırda 3 ajan sıklıkla kullanılmaktadır. Bu ajanlar Aflibercept [Tarrytown, NY]), Bevacizumab (Avastin; Genentech [South San Francisco, CA]), ve Ranibizumab (Lucentis; Genentech) şeklinde olup diyabetik retinopati tedavisinde etkinliği kanıtlanmış ilaçlardır [66]. Etkinliklerini VEGF 'ün VEGF-A subtipini bloke ederek gösterirler. Bevacizumab molekülü 149 kDa'luk IgG yapısında monoklonal bir antikör olup VEGF-A izoformlarını bloke etmektedir fakat hala retina tedavisinde off-label olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda Bevacizumabın DR ve diyabetik maküler ödem (DMÖ)'de etkili olduğu gösterilmiştir. İntravitreal 1.25 mg Bevacizumab enjeksiyonunun DMÖ

tedavisinde etkili olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir [67-70]. Ranibizumab molekülü 48 kDa ağırlığında bir rekombinant Fab fragmenti olup monoklonal Bevacizumab antikorundan elde edilmektedir. Küçük yapısı sayesinde dokulara penetresyon kabiliyeti daha yüksektir. Yapılan çalışmalarda hastalara 0,5 veya 0,3 mg intravitreal enjeksiyonun DMÖ tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir [71]. Aflibercept molekülü ise 115 kDa büyüklüğünde bir molekülü olup Ig G Fc fragmentine bağlı VEGF reseptör 1 ve 2 'yi bağlamak üzere yapısında domain içeren bir rekombinant proteindir. Diğer ant-VEGF moleküllerinden farklı olarak VEGF-A izoformlarını ortamdan reseptörlerine bağlanmadan önce temizler. Aynı zamanda VEGF-B ve plesental growth faktor -1 ve 2 'yi de bloke eder [41][72]. Yapılan alışmalarda DMÖ'li hastalarda görme seviyesinde artış sağlandığı sonucuna varılmıştır [73][74].

- **Kortikosteroid Ajanlar**

Diyabetik retinopatinin en sık görme azlığı nedeni olan diyabetik makular ödemin gelişmesinde ana mekanizma olarak inflamasyon önemli bir rol oynamaktadır. DR de intravitreal kortikosteroid enjeksiyonu bu mekanizmayı bloke etmek için kullanılmakla beraber hedef inflamasyon sırasında ortama göç eden proinflamatuvar hücreler ve lkostazisi bloke ederek prostoglandin, proinflamatuvar sitokinler ve VEGF salınımını bloke etmektedir [75-77]. Aynı zamanda diğer önemli bir hedef ise damar duvarında endotel hücreleri arasındaki tight junctionları güçlendirerek vasküler bariyer fonksiyonunu arttırmaktır [78][79]. Sıklıkla triamsinolon asetonid tercih edilmekle beraber yavaş salımlı dexametazon ve fluosinolon asetonid implantlar da güncel bir şekilde kullanılmaktadır [80-83]. Her üç tedavi yöntemi de etkinliklerini ispatlamış olmalarına rağmen katarakt yapıcı ve göz içi basıncını arttırıcı etkileri kullanımlarını kısıtlamakla birlikte yeni tedavi yöntemler gerekliliğini zorunlu kılmaktadır.

- **Nanotıp Aralıcılı Diyabetik Retinopati Tedavisi**

Nanotıp son yılların popüler tedavi yöntemlerinden olup temel amacı hali hazırda tedavi yöntemi olarak kullanılmakta olan ilaçların hedef dokuda daha etkin ve kontrollü bir şekilde etki göstermesini sağlamaktır. Bu amaçla kullanılan nanopartiküller 1-1000 nm boyutunda olup peptid ve protein yapıdaki ilaçların biyolojik ortamlarda inaktivasyonunun etkili bir şekilde azaltılmasını, devamlı ve kontrollü bir şekilde salınmasını, doku hedeflemenin sağlanması ile biyokullanılabilirliğin artırılmasını ve yan etkilerinin azaltılmasını sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak davranıp mevcut ilaç tedavilerinin etkinliklerini ve güvenilirliklerini arttırmaktadır [84,85].

Tedavi amaçlı kullanılacak ilaçlar çalışılması planlanan nanopartikülün içine hapsedilir yada yüzeyine tutturulurlar. Salım özelliklerini ise kullanılan nanopartikülün biyokimyasal özellikleri ve degradasyon zamanları belirlemektedir. Bu özellikler sayesinde ilaçların terapatik etki göstermeleri için yüksek doz kullanım ihtiyaçları, agregasyonları, enzimatik ve kimyasal degradasyonları azaltılarak yarılanma zamanları arttırılmış olunur. Aynı zamanda suda çözünen ve büyük biyomoleküllü ilaçların dokuya ulaşmalarını da arttırmış olurlar [84,85].

Tedavi amaçlı olarak kullanılan yedi çeşit nanopartikül tipi vardır. Bunlar polimerik nanopartiküller, lipozomlar, PEG-Coated (polietilenglokol kaplamalı) lipozomlar, dendimerler, katyonik nanoemülsiyonlar, nanoyapıda lipid taşıyıcılar (NLC), solid lipid nanopartikül (SLN) olarak sıralanabilir [86]. Polimerik nanopartikül için sıklıkla FDA onaylı PLGA, poli (laktik asit) (PLA), kitozan, polivinil alkol(PVA) ve poli(metil metakrilat)(PMMA) polimerleri kullanılmaktadır [18]. Lipit nanopartikülleri olarak SLN, NLC ve lipozomlar daha çok tercih edilmektedirler ve oküler uygulamaları ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur[87-93]. Dendimerler sıklıkla poliamidoamin (PAMAM) polimerinden oluşurken katyonik nanoemülsiyonlar ise yapılarındaki elektrostatik kuvvetler aracılığıyla insan oküler mukozası ile interaksiyona girerler [94-96].

Nanopartiküllerin hedefleme ve ilaç taşıyıcı sistem özellikleri göz önüne alınarak oküler neovaskülarizasyon ve diyabetik retinopati tedavisinde kullanımları gündeme gelmiştir. Attia ve ark. betametazon sodyum fosfat yüklü nanopartikülleri

oftalmik ilaç taşıyıcı system amaçlı dizayn etmişlerdir [97]. Deepa ve ark. bitki bazlı anyonik polimerleri ve nanopartiküler sistemlerinin oküler taşıyıcı system olarak kullanmışlardır ve Yan et al. betametazon yüklü kitozan-sodyum alginat nanopartiküllerinin mukoadhesiv nanopartikül şeklinde topikal damla olarak kullanımı amaçlı geliştirmeye çalışmışlardır. Sonuç olarak gözün posterior segmentine hedeflemede başarılı sonuçlara ulaşmışlardır [98-100].

Ohira ve ark. dexamethasone γ -cyclodextrin nanopartikül göz damlası ile topikal oküler tedavinin DMÖ tedavisinde makuler ödemin gerilemesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu etkinin subtenon triamsinolon uygulamasının sonuçları ile benzer bir etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır [101]. Mevcut çalışmanın Tanito ve ark. yapmış olduğu çalışmayı da destekler nitelikte olduğu sonucuna da varılmıştır [102]. Lu ve ark. diyabetik ratlarda yapmış olduğu çalışmada bevacizumab-kitozan nanopartiküllerinin intravitreal enjeksiyonu sonrası diyabetik retinopatideki angiogenezi VEGF ekspresyonunu azaltarak baskıladıklarını ve Bevacizumab-kitozan nanopartiküllerinin daha uzun etki süresine sahip olduklarını göstermiştir [103]. Kitozan bazlı Ranibizumab nanopartiküllerinin intravitreal uygulama çalışmaları da yapılmıştır [104]. Deguchi ve ark. streptozotosin enjekte edilmiş ratlarda Nilvadipine nanopartiküllerin topikal uygulaması sonucu retinal disfonksiyonun önlenildiği sonucunu göstermiştir [105].

Solid lipid nanopartiküllerinin (SLN) en temel özellikleri biyotoksisite göstermemeleri olup Li ve ark. tarafından Tetrandrine-SLN oküler ilaç taşıyıcı system olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır [106]. Lallemand ve ark. katyonik nanopartiküllerinin oküler mukozada ilaç retensiyon sürelerini uzattıklarını ve gözün posterior segmentine hedeflemenin arttırıldığını göstermişlerdir [107]. Araujo ve ark. oküler antianjiojenik aktivite amaçlı triamsinolon asetonid yüklü nanostructured lipid taşıyıcıları geliştirmiştir [93]. Abrshami ve ark. gözün posterior segment hastalıklarına yönelik lipozom kaplı bevacizumab geliştirmiştir. Çalışma sonucunda lipozomal bevacizumabın non-lipozomal forma göre vitreusta daha yüksek konsantrasyona ulaştığı sonucuna ulaşmıştır [108]. Kaiser ve ark. yapmış olduğu çalışmada diyabetik retinopati tedavisinde subkonjonktival lipozomal minosiklin enjeksiyonunun ratlarda diyabetik retinopatiyi tedavide

gözün arka segmentine ulaşmada etkili olduğu sonucuna ulaşmıştır [109]. Nanopartikül ilişkili diyabetik retinopati ve diğer göz hastalıkları tedavi çalışmaları umut vadetmekte olup yeni çalışmalara ihtiyaç hala devam etmektedir.

2.5.2 Retinal Ven Tıkanıklığı

Retinal ven tıkanıklığı (RVT), diyabetik retinopatiden sonra dünyada görülen en sık ikinci retinal vasküler hastalıktır. RVT' nın, santral retinal ven tıkanıklığı (SRVT), retinal ven dal tıkanıklığı (RVDT) ve hemiretinal ven tıkanıklığı (HRVT) olmak üzere 3 grupta sınıflandırılır. Bu adlandırma venöz tıkanıklığın olduğu damarsal alana uygun olmakla beraber eğer tıkanıklık optik sinir başının gerisinde ise SRVT, major damar birleşme yerinde ise HRVT ve daha uç dalların herhangi bir kısmında ise RVDT adını almaktadır. En sık görülen tip ise retinal ven dal tıkanıklığıdır. Kadın ve erkeklerde benzer sıklıkta görülmekle beraber yaş ile görülme sıklığı artmaktadır. RVDT' nın dünya çapında görülme sıklığı 0.4% iken SRVT' nın görülme sıklığı 0.08% dir [110]. SRVT görülme sıklığı açısından etnik ve coğrafi farklılık gözlenmezken RVDT Asyalı ve Hispanik nüfusta daha sık izlenmektedir. Tipik olarak tüm retinal ven tıkanıklığı tiplerinde ateroskleroz esas risk faktörünü teşkil etmektedir [111]. Bunun yanında inflamasyon, vazospazm ve kompresyon diğer etkili süreçler arasında yer almaktadırlar [112]. RVDT için major risk faktörleri arteriyel hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet ve trombofilidir. Bu süreçte esas önemli olan arter ve ven çaprazlaşma bölgesinde aretriye duvar kalınlaşması ve bu bölgede venöz bası uygulamasıdır [113-115]. SRVT da ise daha çok glokom, sleep apne sendromu ve özellikle genç yaş grubunda trombofili ile giden hastalıklarla beraber daha sık görülmektedir [114][116-119]. Retinal ven tıkanıklığı ile ilgili diğer sistemik risk faktörleri görülmektedir (Tablo 2.2).

- **Semptom ve Klinik Bulgular**

RVT hastaları bir çok komplikasyon kaynaklı görme azlığı riski ile karşı karşıyadırlar. Bunların arasında makuler ödem, makuler iskemi, optik nöropati, vitreus hemorajisi ve neovaskülarizasyonla giden traksiyonel retina dekolmanı

bulunmaktadır. RVT hastaları genellikle tek taraflı ani, ağrısız görme kaybı şikayeti ile kliniğe başvururlar. Tıkanıklığın gerçekleştiği ve venöz drenajın sağlandığı reti-

Tablo 2.2 Retinal ven tıkanıklığı risk faktörleri

- Hipertansiyon, hiperlipidemi, diabetes mellitus
- Aterosklerotik vasküler değişiklikler: koroner arter hastalığı, yüksek beden kitle indeksi, sigara
- Vaskülitler: sistemik lupus eritematozus, sarkoidoz, sifiliz
- Neoplazi: polisitemia rubra vera, multiple myelom, lösemi
- İlaçlar: oral kontraseptifler, diüretikler
- Anti-fosfolipit sendrom (APS)
- Hiperhomosisteinemi
- Aktive protein C rezistansı (faktör V Leiden mutasyonu)
- Protein C ve S eksikliği
- Antitrombin yetmezliği
- Protrombin gen mutasyonu (G20210A)

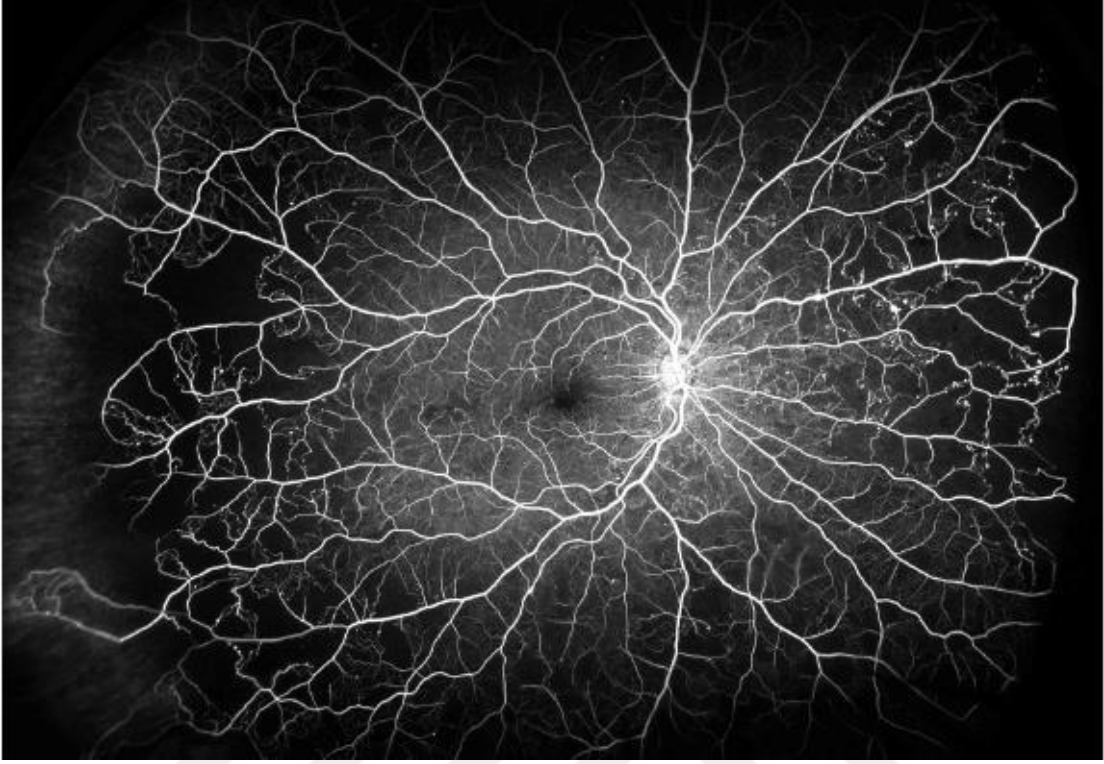
na bölgesi ile ilişkili olarak görme alanı kaybı veya görme azlığı ile başvururlar. Tıkanıklığın geliştiği damarın gerisindeki retina alanında iskemi ve retinal ödem gerçekleşir. Etkilenen retina bölgesinde gelişen retinal iskemi düzeyine göre görme kaybının derinliği ve ilerleyen dönemlerde neovaskülarizasyon gelişip

gelişmeyeceği belirlenmektedir. Görme kaybının esas nedenini ise görme merkezi olan makulanın etkilenmesidir.

Retinal ven tıkanıklığı kaynaklı fundus bulguları retinal ven tıkanıklığı tipine göre farklılık göstermekle beraber esas bulguları tıkanıklık gelişen bölgenin gerisinde oluşan alev tarzında, nokta ve leke tarzında retinal hemorajiler oluşturur [112]. Fundus görüntüsü ven tıkanıklığının şiddetine göre değişiklik göstermektedir. Aynı zamanda akut dönem bulguları ile geç dönem bulguları farklıdır. Karakteristik bulguları arasında alev tarzında, nokta ve leke tarzında retinal hemorajiler ve optik disk ödeminin eşlik ettiği veya etmediği dilate tortiyöz venleri içerir. Eğer tıkanıklık optik disk gerisinde olan santral tip ise optik disk ödemi de tabloya eşlik edebilmektedir [113-115]. Tıkanıklık sonucu gerçekleşen kan-retina bariyerindeki bozulma retina dokusu içine intravasküler alandan plazma sızmasına neden olur. Aynı zamanda ödemli retina sınırında lipit depozitleri birikir. Sinir lifi katmanında oluşan beslenme bozuklukları nedeniyle de cotton-wool spotları denilen yumuşak eksudalar gelişir. SRVT' da tıkanıklığa bağlı gelişen kanamalar, sert eksudalar ve yumuşak eksudalar fundusta 360 derece optik diskten yayılan alevsi kıymık kanamalar şeklinde dört bir kadrana da izlenirler. RVDT' da ise tıkanıklık en sık üst temporal damar arkında gerçekleşir ve tıkanıklık gerisinde kalan retina alanında kanamalar , sert ve yumuşak eksuda bulguları izlenir [113-115].

Kalsik fundus bulguları dışında en sağlıklı muayene yöntemlerinden bir diğeri ve kesin tıkanıklık bölgesinin net bir şekilde anlaşılmasını sağlayan görüntüleme yöntemi fundus fluorescein anjiyografi (FFA)'dir. Tıkanıklık bölgesini net bir şekilde göstermenin yanında perfüzyon bozukluğu olan iskemik alanlarında ayrıntılı bir şekilde gösterilmesini sağlar. Bu sayede retinal ven tıkanıklığı tiplerini iskemik ve non iskemik olmak üzere iki grupta sınıflamak mümkün olur. Tıkanıklık gerçekleşen venöz damar trasesinde temel olarak venöz transit zamanın normalden daha uzun olduğu ve gerisindeki retinal alanda ise beslenme bozukluğu olduğu görülür(Şekil 2.7). FFA ile net bir şekilde makuler iskemi, genişlemiş foveal avasküler zon gösterilebilmektedir. Bu bulgu ciddi beslenme bozukluğu göstergesi olup geri dönüşsüz görme azlığının önemli bir ipucudur. FFA aynı zamanda iskemi

kaynaklı kronik dönemde gelişecek retinal neovaskülarizasyonları ve tekrar beslenmeyi sağlayacak venöz kollaterallerin (damar şantları) ayrımını sağlar.

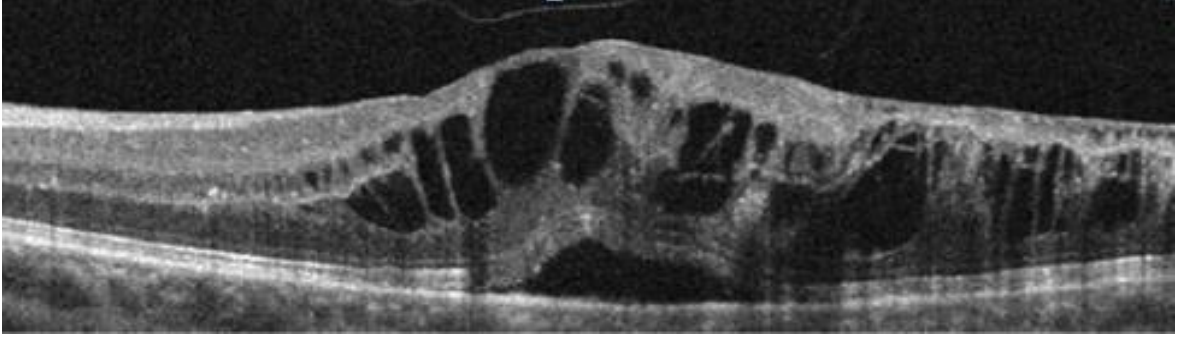


Şekil 2.7 Santral retinal ven tıkanıklığına bağlı periferik iskemik alanların FFA görüntüsü [120]

FFA bulgularına göre SRVT ve RVDT iki ana gruba ayrılır;

1. SRVT hastalarında 10 optik disk alanından küçük, RVDT hastalarında ise 5 optik disk alanından küçük retinal iskemi alanı içeren ven tıkanıklıklarına non-iskemik retinal ven tıkanıkları denilir,
2. İris düzeyinde neovaskülarizasyonun bulunduğu ve 10 veya 5 optik disk çapından geniş retinal iskemi alanı içeren SRVT ve RVDT ven tıkanıklıklarına ise iskemik tipte retinal ven tıkanıkları denilir.

Diğer bir iskemik ve non-iskemik SRVT ayrımı yapan yöntem ise flicker ERG (elektroretinogram)' dır [121]. Maküler ödemin kesin tomografik olarak gösterilmesi ise optik kohorens tomografi (OKT) ile yapılır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Retinal ven tıkanıklığına bağlı maküler ödem bulgularının OKT ile gösterimi [120]

- **Retinal Ven Tıkanıklığı Tedavisi**

Retinal ven tıkanıklığı tedavisi tıkanıklık sonrası gelişen iskemik veya ödemli alan tedavisi veya geç dönemde gelişebilecek oküler neovasküler komplikasyonlar yönetimi şeklindedir. Aynı zamanda sistemik risk faktörlerinin kontrolü tıkanıklık sonrası sağlıklı gözde gelişebilecek yeni bir vasküler tıkanıklığın önüne geçmek için önemlidir.

RVT tedavisinde bir henüz etkin bir tedavi olmakla birlikte mevcut tedaviler RVT kaynaklı gelişmiş olan maküler ödem ve neovaskülarizasyonu tedaviye yöneliktir. Bu amaçta başta intravitreal anti-VEGF enjeksiyonları, intravitreal steroid enjeksiyonları ve lazer fotokoagüasyon en sık kullanılan üç tedavi yöntemidir.

- **İntravitreal Anti-VEGF Enjeksiyonu**

İntravitreal ilaç enjeksiyonu RVT nedeniyle oluşam maküler ödemin tedavisinde ana amaç maküler ödeme neden olan başta vasküler endotelyal growth faktor olmak üzere bir çok sitokinin salınımını bloke etmektir. Bu moleküller retinal iskemi kaynaklı iç ve dış kan-retina bariyerinin yıkılması sonucu salgılanır [122,123]. Bu amaçla 3 tip anti-VEGF ajan kullanılmaktadır [124]. Bu ajanlar Aflibercept, Ranibizumab ve Bevacizumab' dır.

- **İntravitreal Kortikosteroidler**

Günümüzde makuler ödemini tedavi etmek için sıklıkla 3-6 ay etkisini tek bir enjeksiyon sonrası gösterebilen biyobozunur bir material olan ozurdex steroid implanlar kullanılmaktadır. Etkin madde olarak implanta yüklü olan molekül dexametazon molekülü olup PLGA polimeri ilaç taşıyıcı molekül olarak kullanılmaktadır. Fakat intraoküler basınç artışı ve katarakt formasyonu gibi bir çok yan etkisi gösterilmiştir [125].

- **Lazer Fotokoagülasyon**

Retinal ven tıkanıklığı tedavisinde, takip sürecinde iskemik sahalar kaynaklı gelişen oküler neovaskularizasyonun gerilemesi veya gelişmesini önlemek ve makuler ödemini tedavi etme amaçlı sıklıkla klinik pratikte tercih edilmektedir [126].

2.5.3 Senil Makula Dejeneransı

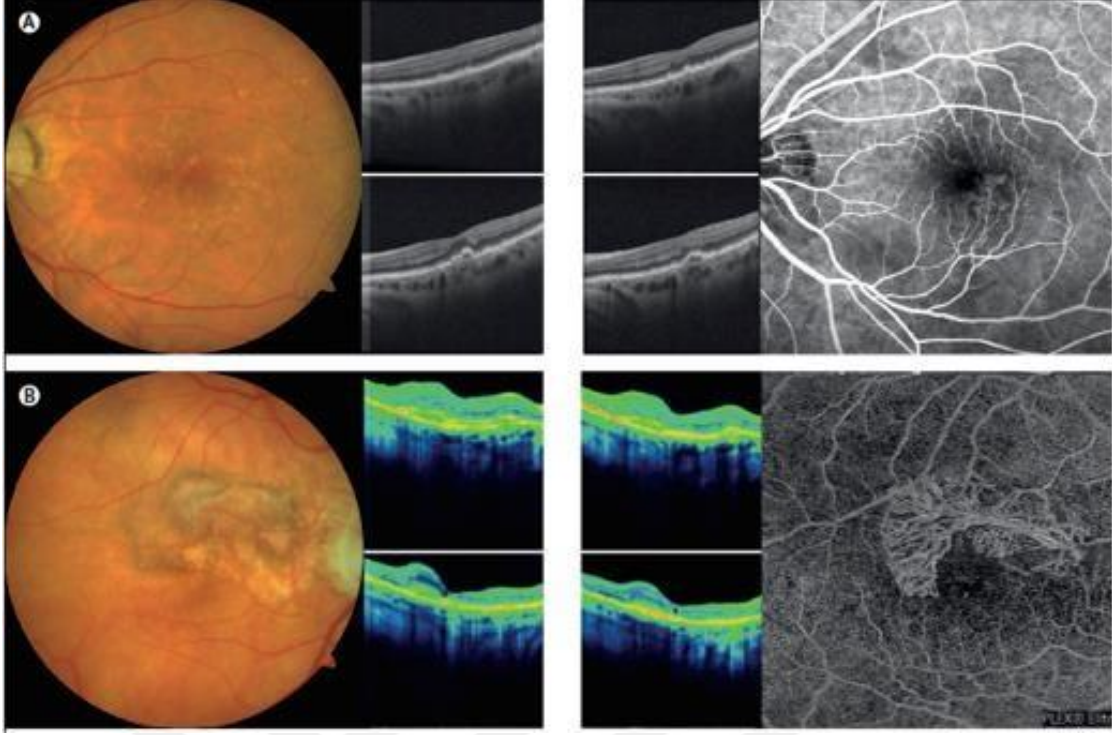
Senil makula dejeneransı (SMD) 50 yaş üstü hasta grubunda görülen, görme merkezini etkileyen dejeneratif bir hastalıktır. İlk kez 1885 yılında tanımlanmıştır ve günümüzde nörodejeneratif bir hastalık olarak da kabul görmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise 65 yaş üstü popülasyonun en sık görme azlığı sebebidir [127,128]. Patofizyolojik mekanizması ve etyolojisi tam olarak anlaşılamamakla beraber yaşlanma sürecinde RPE hücrelerinin retinanın fotoreseptörlerinden ortaya çıkan artık maddeleri temizleme sürecindeki yetersizlik ya da koridal vasküler bir bozukluk sonucu ortaya çıkabileceği düşünülmektedir [129]. Bu bölgede hastalık gelişimi ile ilişkili olacak şekilde retina pigment epiteli düzeyinde bozukluklar ve drusen denilen madde birikintileri ortaya çıkmaktadır. Erken dönem SMD hastalarında tek bulgu RPE hücre değişikliği ve drusen varlığı olurken, geç dönem hastalarda neovasküler damar gelişimi veya coğrafik atrofi görülebilmektedir.

Senil makula dejeneransı drusen sayısı ve çapına göre erken dönemden ileri evreye değin sınıflandırılabilceği gibi, makula bölgesinde neovasküler gelişim veya atrofi gelişimine göre de sınıflandırılabilir. Makula bölgesinde gerçekleşen bu bulgulara göre iki tipe ayrılabilir;

1. Eksudatif (Neovasküler) senil makula dejeneresansı (Yaş tip)
2. Atrofik senil makula dejeneresansı (Kuru tip)

- **Neovasküler Senil Makula Dejeneresansı Patofizyolojisi**

Retinanın RPE hücre tabakası altında koroidal damar ağı bulunmaktadır. Koroidal damar ağı gözün dışından içine doğru Haller tabakası, Satler tabakası ve en ince koryokapillaris tabakası olmak üzere 3 tabaka halindedir. RPE hücreleri Bruch membran vasıtasıyla koryokapillaris üzerinde oturur ve beslenmesini bu damar yatağından almaktadır. Aynı zamanda retina katmanlarından ve fotoreseptörlerden kaynaklanan artık maddeleri de Bruch membran aracılığıyla bu damar yatağına iletir. Bu besin ve artık madde iletim trafiği sırasında Bruch membran boyunca veya RPE altında drusen adını alan madde birikimleri gerçekleşir. Koryokapillaris vasküler yapısı perisit hücrelerinden fakir ve pencere yapı özelliği göstermektedir. Aynı zamanda koryokapiller hücreler oksidatif stress sonrası salınan bir takım faktörlere cevaben neovasküler özellik gösterebilmektedir. Koryokapillaris komşuluğunda olan RPE hücreleri oksidatif stress altında ve yaşlanma ile bir takım faktörler salgırlar. Bu süreçte salgıladıkları en önemli faktor VEGF-A' dır [130]. VEGF-A gene RPE hücrenin gerçekleştirdiği kompleman aktivasyonu ile birlikte koryo kapiller hücrelerde oküler neovaskularizasyonu başlatır [131,132]. Böylece RPE altında neovasküler bir süreç başlamış olur ve oluşan bu yeni damar ağına neovasküler membran denilir. Bu yeni oluşan damar ağı vücudun diğer damar ağlarından farklı olarak oldukça zayıftır ve intravasküler içeriğın damar dışına sızmasına neden olur. Bu durum neovasküler membran kaynaklı makuler bölgede sıvı, kanama veya eksuda oluşumu ile sonuçlanır. Makuler bölgede biriken bu sıvı ve kanama nedenli görme azlığı gerçekleşmektedir.



Şekil 2.9 A. Erken evre SMD ve fundus fotoğrafı, optik kohorens görüntülemeye drusen varlığı, B. Her üç görüntüleme tekniğinde de neovasküler makula dejenerasyonu bulguları [133]

- **Neovasküler Senil Makula Dejenerasyonunun Tedavisi**

Kuru tip senil makula dejeneransı geri dönüşsüz makula atrofisi ile sonuçlanırken hali hazırda mevcut bir tedavisi bulunmamaktadır. Bir takım besin takviyesi içeren oral preparatlarla geç dönem atrofik SMD nin önlenebileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır [133]. Fakat yaş tip yani neovasküler senil makula dejeneransı patolojisinde altta yatan yeni bir damar oluşumu söz konusu olduğu için tedavi sürecinde bu neovasküler membranın geriletilmesi ana hedefi oluşturmaktadır. Bu amaçla fizyopatolojiden esas sorumlu ajan VEGF-A'nın blokajı amaçlı anti-VEGF ajanlar kullanılmaktadır. Esas hedef VEGF aracılı artmış vasküler permeabiliteyi azaltmak ve neovasküler membranın gerilemesini sağlamaktır [134]. Bu amaçla her üç anti-VEGF ajan da klinikte intravitreal enjeksiyon amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bevacizumab SMD tedavisinde tıpkı diyabetik retinopati ve RVT tedavisinde olduğu gibi off label olarak kullanılırken, MARINA ve ANCHOR çalışmaları ile aylık ranibizumab enjeksiyonlarının SMD tedavisinde etkili olduğu

gösterilmiştir [135,136]. Takibinde yapılan CATT çalışması ile de Bevacizumab ve Ranibizumab etkinliği açısından anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir [137]. Daha sonra VIEW çalışmaları ile Aflibercept kullanıma girmiştir ve ilk 3 aylık yükleme dozu sonrası 2 ay arayla yapılan Aflibercept enjeksiyonlarının etkinliğinin aylık yapılan Ranibizumab enjeksiyon sonuçları ile benzer olduğu görülmüştür. Böylece Aflibercept kullanımı ile iki enjeksiyon arasındaki süre uzatılmıştır [138]. Hali hazırda klinikte kullanılan bu üç anti-VEGF ajan dışında tedavi amaçlı Faz 3 çalışmalar yeni ajanları değerlendirmek amacıyla tüm hızıyla devam etmektedir.

2.6 Nanoteknoloji ve Nantaşıyıcı Sistemler

İl kez 1959 yılında Feynman tarafından nanoteknolojinin tanımının yapılmasından bu yana terapötik ve diagnostik kapasitesi geliştirilmiş ajanlar sunmak için nanoteknoloji temeli çalışmalar son hızla devam etmektedir. Klinik aşamaya ulaşmış ve ticarileştirilmiş nanoterapötiklerin ve nanodiyagnostiklerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Geleneksel yöntemlerin uygulanarak vücuda ilaç uygulanması , spesifik olmayan bir şekilde ilacın tüm vücuda dağıtılmasıyla sonuçlanmaktadır. Ayrıca vücutta çok az ilaç istenen fizyolojik hedef dokuya veya hücre tipine de ulaşabilmektedir. Bu durum hedef dokuda daha düşük ilaç etkinliği ve hedef olmayan vücudun diğer bölümleri üzerinde de istenmeyen yan etkiler ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle nanoteknoloji ile hedeflemeli tedavi ve kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler hastalıkların tedavisinde önemli bir çalışma sahası haline gelmiştir.

NNI (National Nanotechnology Initiative) tanımına göre nanomateryaller 1 ila 1000 nm arasında değişen boyutlarda bulunmaktadır. Ancak, "nano" öneki genellikle birkaç yüz nanometre büyüklüğünde parçacıklar için kullanılır. Nano boyutta malzemeler (ilaç / çoklu ilaç ve / veya görüntüleme ajanı) nantaşıyıcı olarak da adlandırılabilir. Nano taşıyıcıların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının konvansiyonel ilaç uygulama yöntemine göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Optimize edilmiş fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip nanopartikülleri hücreler, daha büyük olan moleküllerden daha kolay yapılarına alırlar ve dolayısıyla biyoaktif bileşikler için ideal bir ilaç dağıtım aracı olarak

kullanılabilirler. Aynı zamanda ilaç taşıyıcı sistemleri geniş yüzey alanları ile, taşınacak moleküller için yüksek miktarda bir taşıyıcı bağlanma alanı oluşturarak nano taşıyıcı sistemleri ideal birer taşıyıcı sistem haline getirmektedir.

Nanotaşıyıcı sistemleri konvansiyonel ilaç uygulama yöntemlerine göre avantajları aşağıdaki gibidir;

1. İlaç yapısının erken bozulmasını önler,
2. İlacın dolaşımında kalma süresini uzatır,
3. İlaçların bozulmadan daha uzun süre beklemesini ve raf ömrünü uzatır,
4. Hedef dokuya daha fazla miktarda ilaç ulaşması sağlanır,
5. Hedef doku/hücrelerde kontrollü ilaç salımı sağlanmış olur,
6. Artmış hücre içi penetrasyon sağlanır

Nanotaşıyıcı aracılı ilaç hedeflenmesi ile bir takım önemli etkiler amaçlanmaktadır; bunlardan en önemlisi ilacın etki bölgesine seçici bir şekilde ulaşmasını, absorpsiyonunu ve dağılmasını sağlamaktır. Bunun dışında sistemik dolaşıma verilen ve hedef dokuya yeterli konsantrasyonda ulaşamadığı için daha yüksek dozda kullanılmak zorunda kalınan ilaçların istenmeyen yan etkileri ve toksik etkileri azaltılmış olur. Böylece en uygun terapotik etki minimum zararla sağlanmış olunur. Vücuda verilen ilaçların etkileri hedeflemeli tedavi uygulanmayan durumlarda tüm vücutta görülürken hedeflemeli tedavide hedeflenen ilaç reseptörü ile etki sadece hedeflenen dokuda sağlanmış olur. Bu durum istenmeyen doku ve organ etkileşimlerinin önüne geçmiş olur. Aynı zamanda hedeflemeli tedavi ile tüm vücuda ilaç dağılımı gerçekleşmediği için daha düşük dozda ilaç kullanımı sağlanabilmektedir [139,140].

İlaç taşıyıcı sistemler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

1. Veziküler sistemler

Lipozomlar

Niozomlar

Eritrosit

2. Katı Partiküler Sistemler

Mikroküreler

Nanopartiküller

Polimerik Miçeller

Dendimerler

Hidrojeller

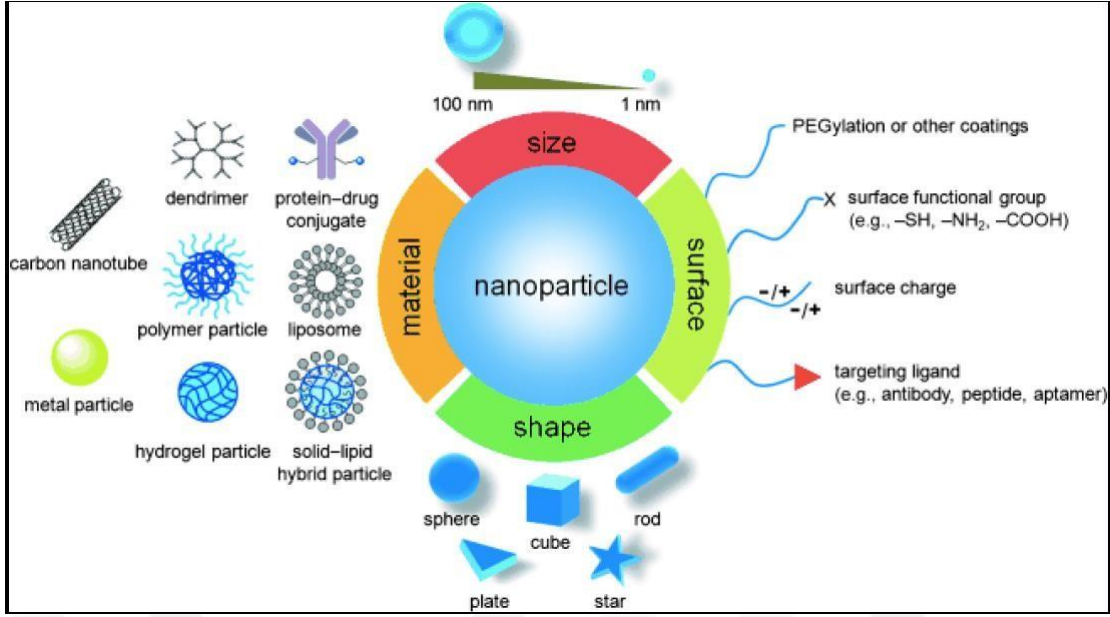
3. Etkin Madde Polimer Konjugatları

4. Çoklu Emülsiyonlar ve Mikroemülsiyonlar

Katı lipid nanopartiküller, silikon veya karbon malzemeler, protein nanopartiküller ve manyetik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistem olarak test edilmiş diğer nanotaşıyıcı sistem örneklerdir (Şekil 2.10).

İlaç taşıyıcı sistemlerin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi maddelendirilebilmektedir;

- Taşıyacağı ilaç ile herhangi bir etkileşime girmemeli ve ilacın inert yapısı devam edebilmeli,
- Biyoyumlu ve biyobozunur karakterde olup vücut için toksik etki göstermemeli,
- Hedeflenen dokuya ulaşana kadar yapısındaki ilacı salmadan taşıyabilmeli,
- Vücut ortamına ve fizyolojik şartlara dayanıklı olmalı,
- Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilme kapasitesi olmalı,
- Vücutta kullanım için sterilizasyon koşullarına elverişli olmalı,



Şekil 2.10 Nanotaşıyıcı sistemler ve şematik görünümü [141]

2.7 Nanopartiküller ve Göz Hastalıklarındaki Güncel Kullanımı

Nanotıp son yılların popüler tedavi yöntemlerinden olup temel amacı hali hazırda tedavi yöntemi olarak kullanılmakta olan ilaçların hatta genetik materyalin hedef dokuda daha etkin ve kontrollü bir şekilde etki göstermesini sağlamaktır. Bu amaçla kullanılan nanopartiküller 1-1000 nm boyutunda olup peptid ve protein yapıdaki ilaçların biyolojik ortamlarda inaktivasyonunun etkili bir şekilde azaltılmasını, devamlı ve kontrollü bir şekilde salınmasını, doku hedeflemenin sağlanması ile biyokullanılabilirliğin artırılmasını ve yan etkilerinin azaltılmasını sağlamaktadır. Bu özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak davranıp mevcut ilaç tedavilerinin etkinliklerini ve güvenilirliklerini arttırmaktadır.

Nanopartiküller doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanabilirler ve hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılırlar. Etkin madde partikül içinde çözündürülebilir, hapsedilebilir, yüzeye adsorbe edilebilir yada bağlanabilir. Nanokapsüller, vezikül yapıdaki sistemlerdir ve ilaç bir boş vezikül kavitesine hapsedilerek polimer bir mebranla çevrelenir. Nanoküreler ise

matriks sistemlerdir, burada ilaç fiziksel olarak ve uniform olarak disperse haldedir [142].

Tedavi amaçlı nanopartiküllerin yüzeyine tutturulan ya da içine hapsedilen nanopartiküllerin salım özelliklerini ise kullanılan nanopartikülün biyokimyasal özellikleri ve degradasyon zamanları belirlemektedir. Bu özellikler sayesinde ilaçların terapatik etki göstermeleri için yüksek doz kullanım ihtiyaçları, agregasyonları, enzimatik ve kimyasal degradasyonları azaltılarak yarılanma zamanları arttırılmış olur. Aynı zamanda suda çözünen ve büyük biyomoleküllü ilaçların dokuya ulaşmaları da arttırılmış olunur [84][85].

Tedavi amaçlı olarak kullanılan değişik nanopartikül tipleri bulunmaktadır. Bunlar polimerik nanopartiküller, lipozomlar, PEG-Coated lipozomlar, dendimerler, albumin (protein) ve kitozan (karbonhidrat) nanopartikülleri olarak sıralanabilir (Şekil 2.11) [18]. Polimerik nanopartikül için sıklıkla FDA onaylı PLGA, PLA, kitozan, PVA ve PMMA polimerleri kullanılmaktadır. Lipit nanopartikülleri olarak lipozomlar daha çok tercih edilmektedir ve oküler uygulamaları ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur [87-93]. Dendimers sıklıkla polyamidoamine (PAMAM) polimerinden oluşurken katyonik nanoemulsiyonlar ise yapılarındaki elektrostatik kuvvetler aracılığıyla insan oküler mukozası ile interaksiyona girerler [94-96].

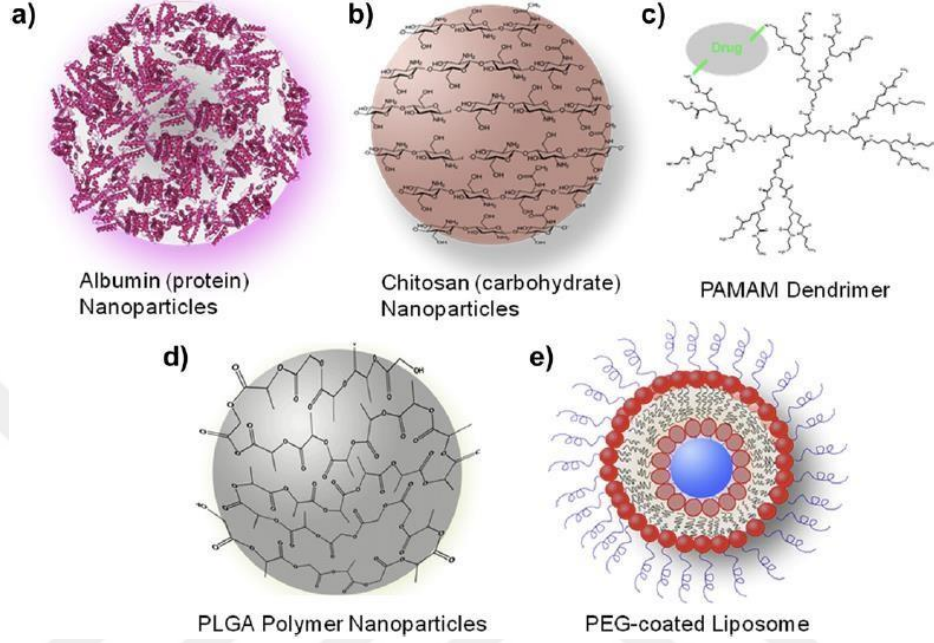
Nanopartiküllerin hedefleme ve ilaç taşıyıcı sistem özellikleri göz önüne alınarak oküler neovaskülarizasyon ve diyabetik retinopati tedavisinde kullanımları gündeme gelmiştir. Attia ve ark. betametazon sodyum fosfat yüklü nanopartikülleri oftalmik ilaç taşıyıcı sistem amaçlı dizayn etmişlerdir [97]. Deepa ve ark. bitki bazlı anyonik polimerleri ve nanopartiküllerini ilaç taşıyıcı sistem olarak çalışmışlar ve Yan ve ark. betametazon yüklü kitozan-sodyum alginat nanopartiküllerini mukoadeziv nanopartikül şeklinde topikal damla olarak kullanımı amaçlı geliştirmeye çalışmışlardır. Sonuç olarak gözün posterior segmentine hedeflemede başarılı sonuçlara ulaşmışlardır [98-100].

Ohira ve ark. dexametazon γ -siklodextrin nanopartikül yapısındaki göz damlası ile topikal oküler tedavinin DMÖ tedavisinde makuler ödemin gerilemesinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu etkinin subtenon triamsinolon uygulamasının sonuçları

ile benzer bir etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır [101]. Mevcut çalışmanın Tanito ve ark. yapmış olduğu çalışmayı da destekler nitelikte olduğu sonucuna da varılmıştır [102]. Lu ve ark. diyabetik ratlarda yapmış olduğu çalışmada bevacizumab-kitozan nanopartiküllerinin intravitreal enjeksiyonu sonrası diyabetik retinopatideki angiogenezi VEGF ekspresyonunu azaltarak baskıladıklarını ve bevacizumab-kitozan nanopartiküllerinin daha uzun etki süresine sahip olduklarını göstermiştir [103]. Kitozan bazlı ranibizumab nanopartiküllerinin intravitreal uygulama çalışmaları da yapılmıştır [104]. Deguchi ve ark. streptozotisin enjekte edilmiş ratlarda Nilvadipine nanopartiküllerin topikal uygulaması sonucu retinal disfonksiyonun önlenebildiği sonucunu göstermiştir [105].

Solid lipid nanopartiküllerinin (SLN) en temel özellikleri biyotoksisite göstermemeleri olup Li ve ark. tarafından Tetrandrine-SLN' ı oküler ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanmış ve kullanılmıştır [106]. Lallemand ve ark. katyonik nanopartiküllerinin oküler mukozada ilaç emilim zamanlarını uzattıklarını ve gözün arka segmentine hedeflemenin arttırıldığını göstermişlerdir [107]. Araujo ve ark. oküler antianjiojenik aktivite amaçlı triamsinolon asetonid yüklü nanoyapıda lipit taşıyıcıları geliştirmiştir [93][97]. Abrshami ve ark. gözün arka segment hastalıklarına yönelik lipozom kaplı Bevacizumab geliştirmiştir. Çalışma sonucunda lipozomal Bevacizumabın non-lipozomal forma göre vitreusta daha yüksek konsantrasyona ulaştığı sonucuna ulaşmıştır [108]. Kaiser ve ark. yapmış olduğu çalışmada diyabetik retinopati tedavisinde subkonjonktival lipozomal minosiklin enjeksiyonunun ratlarda diyabetik retinopatiyi tedavide gözün arka segmentine ulaşmada etkili olduğu sonucuna ulaşmıştır [109]. Klinik kullanımda ve Faz 3 aşamada olan iki nanolipozom olup bunlardan ilki Visudyne (Novartis Pharmaceuticals,USA) 2000 yılında senil makula dejenerasyonlu (SMD) hastalarda baskın subfoveal koroidal neovaskülarizasyon için FDA onayı almıştır. İkinci molakül ise Photrex (Miravant Medical Technologies,USA) SMD tedavisinde Faz 3 aşamasında olup FDA onayı beklemektedir [143]. Yavuz ve ark. değişik boyutta dexamethasone (PAMAM) dendimer komplekslerinin diyabetik retinopatide de kullanımını çalışmış ve çalışılan hayvan modelinde anyonik dexametazon dendimer (PAMAM) kompleksinin oküler dokularda dendimer kompleksi olmayan

formülasyonlara göre daha yüksek düzeye ulaştığını göstermiştir [144]. Nanopartikül ilişkili diyabetik retinopati ve diğer göz hastalıkları tedavi çalışmaları umut vadetmekte olup yeni çalışmalara ihtiyaç hala devam etmektedir.



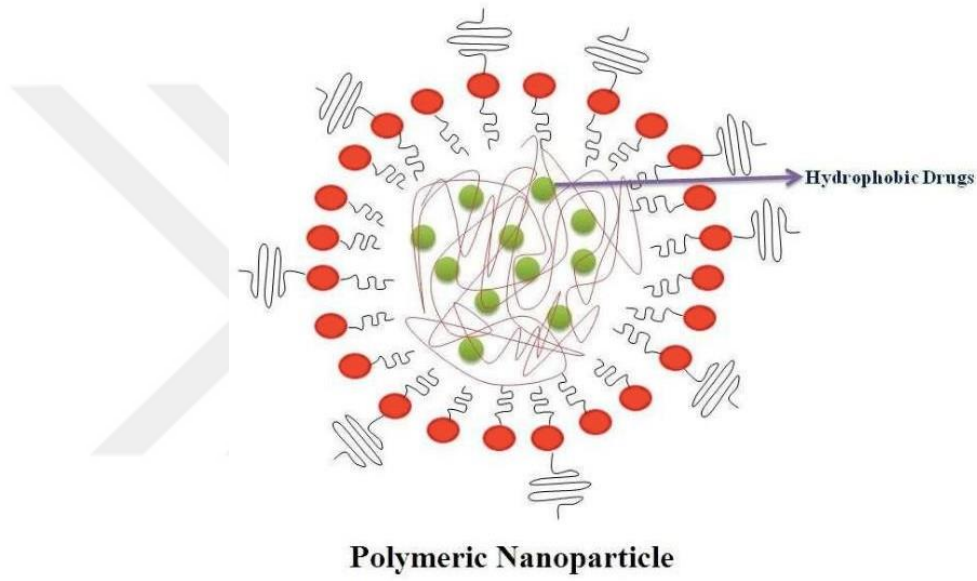
Şekil 2.11 Taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanopartikül tipleri [18]

2.7.1 Göz Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılan Nanopartikül Tipleri

- **Polimerik Nanopartiküller**

Polimerik nanopartiküller hedeflenen dokuda minimum yan etki ile en efektif devamlı ilaç salınım sistemleri olarak uzun süredir çalışılmaktadır. Boyutları 10-1000 nm arasında olup koloidal yahut katı parçacıklar halindedir (Şekil 2.12). Polimerik nanopartiküllerin sentezinde iki tip polimer kullanılmaktadır bunlar doğal ve sentetik yapıda olmak üzere iki sınıftır. Polimerik nanopartiküllerin sentezinde kullanılan doğal polimerler kitozan, nişasta, alginat ve selüloz gibi polimerlerdir, poli β -hidroksibutirat (PHB), polilaktik asit (PLA), poliüretan poli

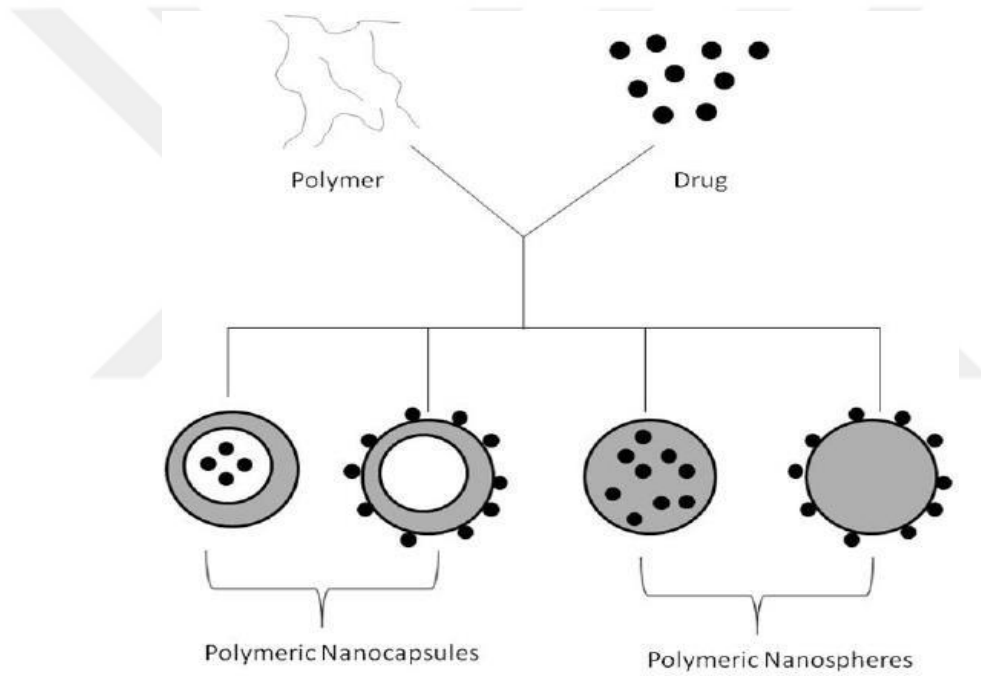
laktik-ko-glikolik asit (PLGA), poly(metil metakrilat)(PMMA) ise sentetik polimerik yapılarıdır [145]. Tedavi amaçlı sentezlenen polimerik nanopartiküllerde sıklıkla kullanılan polimerler ise poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA), poli (laktik asit)(PLA), kitozan, polivinil alkol(PVA) and poli(metil metakrilat)(PMMA) polimerleridir. Bu polimerler FDA tarafından kullanıma onay almış polimerlerdir [18].



Şekil 2.12 Sentez sonrası polimerik nanopartiküllerin şematik görünümü [146]

Polimerik nanopartiküller aracılı ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç nanopartiküllerde çözdürülebilir, hapsedilebilir, kapsüllenebilir yahut polimerik matrikse bağlanabilirler (Şekil 2.13). Bu şekilde sentezlenen sistemlerin ne kadar ideal olacağı sentezlenen partikülün boyutu, şekli, yüklenen ilaç miktarı ve partikülün yüzey yükü ile ilişkilidir. Polimerik nanopartiküllere ilaç yüklenmesi iki ana şekilde yapılabilmektedir. İlk yöntemde nanopartiküllerin üretilmesi esnasında ilaçların nanopartiküllerle birleştirilmesi söz konusu iken ikinci yöntemde nanopartiküller elde edildikten sonra ilaç içeren solüsyonla inkübe edilmesi ve

böylece nanopartiküllere ilaç adsorbsiyonu ile gerçekleştirilir. İlk yöntemde ilaç yükleme kapasitesi daha yüksek olmaktadır [142]. Polimerik nanopartiküllere ilaç yüklenmesi suda çözünen ilaçlar için ayrıca konjugasyonu yolu ile de olmaktadır. Böylece her 3 yöntem aracılığıyla hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıda ki ilaçlarla polimerik nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Böylece farklı polimerik ajanlarla farklı yapıda nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler olarak sentezlenebilmektedir. Bu durum polimerik nanopartiküller için ilaç taşıma süreleri, miktarları ve dolaşımında ya da hedef dokuda bulunma miktar ve süreleri açısından önemli bir avantaj sağlar [142][147].



Şekil 2.13 Polimerik yapıdaki nanopartiküller. İlaç nanopartiküllere hapsedilir ya da yüzeylerine adsorbe edilir [148]

- **Polimerik Nanopartiküllerin Avantajları**

Polimerik nanopartiküllerin en temel özellikleri biyoyumlu ve biyobozunur özellikleri sayesinde vücut kapillerleri boyunca nano boyutları ile hedef dokuya ulaşabilmemeleri ve hedeflenen dokuda biyobozunum gerçekleşmekte iken

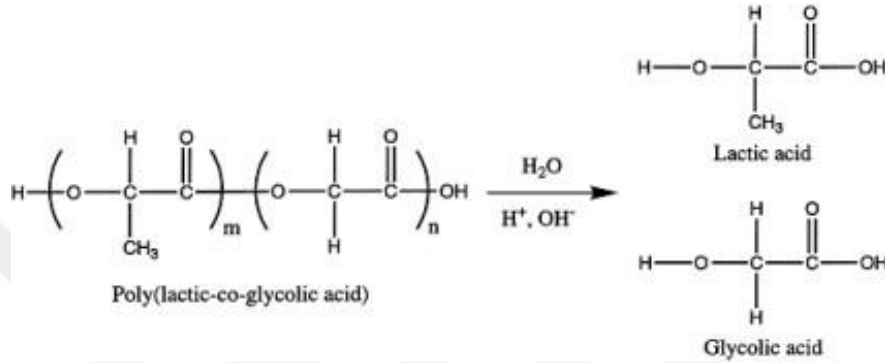
yapısındaki ilacı salmalarıdır. Bu iki ana avantajın dışında diğer avantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Kolay sentezlenebilirler, vücut ortamında biyobozunuma uğrarlar ve ortaya çıkan ürünler vücuda toksik değildir,
- Hedeflenen madde yüklenme kapasiteleri yüksektir, hedeflenen dokuya yeterli miktarda ilaç ulaşımını sağlayabilirler,
- Taşınan ilaç dışında, yüzeylerine hedeflenen bölgedeki yapıları tanıyan özel moleküller bağlanarak taşınan maddenin lokalizasyonu belirlenebilir,
- Vücut sıvılarında stabiliteleri yüksektir ve böylece yapılarında taşıdıkları ilaçları uzun süre bozulmadan taşıyabilirler,
- Hücre içine girebildikleri için hedeflenen hücre grubunda istenen yanıt alınabilir,
- Hedeflenen bölgede ilaç salımı gerçekleşeceği için ilaca bağlı istenmeyen yan etkiler hedeflenen doku dışında gözlenmez,
- Nanopartiküllerin katı şekilleri uzun süre ve ilave saklama koşullarına gerek kalmadan muhafaza edilebilirler,
- İlave madde gereksinimi olmadan kolaylıkla parenteral yoldan uygulanabilirler,

- **Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)**

Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit), glikolik asit ve laktik asit monomerlerinin değişik oranlarda bir araya getirilmesiyle oluşmuş bir kopolimerdir. Yüksek biyoyumluluğu ve biyobozunur özelliği sayesinde ilaç taşıyıcı sistemler için en sık kullanılan polimer olma özelliği göstermektedir. PLGA'nın kristal yapısı kopolimer olarak iki monomerin birleşim oranına (molar) bağlı olarak değişmektedir. Bu özellik ise sentezlenen nanopartikülün ilaç salımıyla ilgili karakteri üzerine etkilidir [149,150]. PLGA yapısındaki glikolik asit hidrofilik özellikte olup vücut

sıvılarında ve hücre içinde kolayca çözünebilmektedir. Laktik asit ise yapısındaki metil grupları sayesinde hidrofobik özellik gösterir ve biyobozunma süresi uzundur. Bu iki molekülün birleşiminden oluşan PLGA birleşim oranına bağlı olarak biyobozunurluk ve moleküler ağırlık özelliklerine sahiptir [151]. Molekül yapısındaki glikolik asit oranı arttıkça moleküler ağırlık azalmakta ve suda çözünürlük (biyobozunurluk) artmaktadır [149].



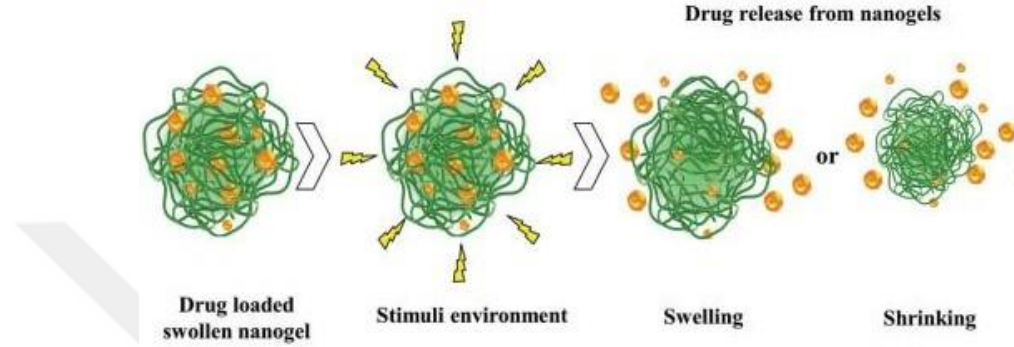
Şekil 2.14 Laktik asit, Glikolik asit ve Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'nın kimyasal yapıları [152]

Vücutta PLGA nanopartikülleri biyobozunum süreci içerisinde tekrardan glikolik asit ve laktik asit monomerlerine parçalanmaktadır (Şekil 2.14). Bu iki monomer ise sitrik asit siklusuna girerek su (H₂O) ve karbondioksit (CO₂)'e dönüşmektedir [149]. Bu son ürünler ise vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılmaktadır.

- **Polimerik Nanojel ve Hidrojeller**

Nanojeller nano ölçekte hidrofilik polimerlerik ağ yapısından oluşan hidrojelleridir. Yapısına ilaç moleküllerinin doğrudan dengeli bir biçimde su ile şişirilme sırasında eklenmesi ile ilaç bağlanması gerçekleştirilir. Takibinde solvent maddenin uzaklaştırılması sağlanır ve kompakt yapıda paketlenmiş nanopartiküller elde edilmiş olur. Tekrar su ile temas halinde yapısındaki ilacı kontrollü bir şekilde salarlar. Kullanılan polimerik materyale göre hidrojel ağın içerisine hidrofilik yahut hidrofobik ilaçlar bağlanabilir. Eklencek ilaç miktarını ağın yapısındaki polimerler arasındaki çapraz bağ miktarı belirlemektedir. İlaç

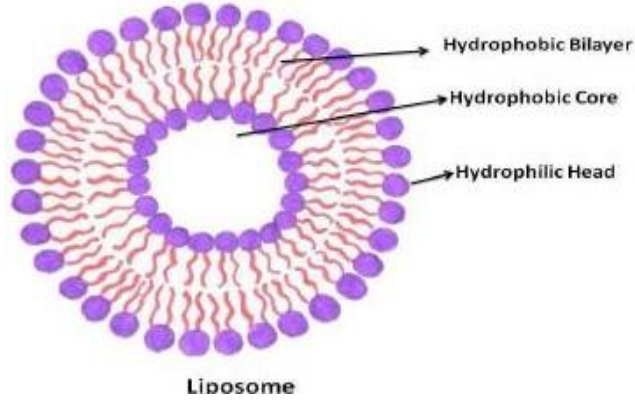
yüklenmesi gibi ilaç salım profili gene bu çapraz bağlar tarafından belirlenmektedir. Aynı zmanada bir takım dış uyarılar hidrojellerin ilaç salım özelliklerini belirleyebilmektedir (Şekil 2.15). Eğer bu dış etken Ph veya sıcaklık ise etkene göre Ph duyarlı hidrojel veya sıcaklık duyarlı nanojeller olarak isimlendirilirler [18].



Şekil 2.15 Dış etken uyarısı sonrası polimerik nanojellerden ilaç salımı [153]

- **Lipozomlar**

Lipozomlar biyoyumlu ve biyobozunur yapıda lipid bazlı nanopartiküller olup iki katmanlı fosfolipit yapısında ilaçları ya merkezi aköz fazda hapsederler ya da ikili fosfolipit tabakası arasında tutarlar(Şekil 2.16). Değişik boyutlarda tek veya çoklu katmanlı yapıda bulunabilmektedir. Boyutlarına, yüzey yüklerine, lipid içeriklerine bilaminer fosfolipit tabakası akışkanlığını ve hazırlanma metoduna göre çeşitlendirilebilirler. Hidrofilik ve hidrofobik ilaçların taşınımını sağlayabilirler. Hidrofilik ilaçları merkezdeki aköz korda taşırlarken hidrofobik ilaçları bilaminer yapı arasında taşıyabilirler [18]. Günümüzde göz hastalıklarının tedavisinde klinik kullanımda olan verteporfin lipzomal yapıda bir ajandır ve klinik kullanımda etkili sonuçlar vermektedir [154].



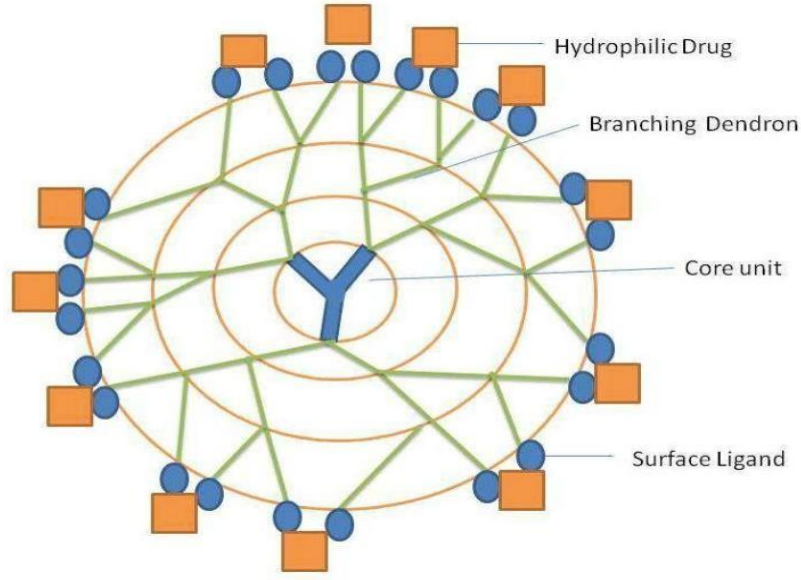
Şekil 2.16 Lipzom nanopartiküllerin şematik görünümü [155]

- **Miçeller**

Miçeller lipozomlara benzemekle beraber lipozomlardan farklı olarak bilaminer yapı göstermezken kendinden amfifilik yani hem hidrofobik hem de hidrofilik özellik gösteren nanopartiküllerdir. Amfifilik özellik gösteren üniteler hidrofobik ve hidrofilik yapı içeren kopolimerlerden oluşmaktadır. Polimerik miçeller hidrofobik kolonlardan oluşan bir merkez ve dış kabuğu oluşturan hidrofobik polimerlerden oluşmuş küresel partiküllerdir [156]. Sıklıkla polietilenglikon agregasyona olan direnci ve uzun sirkülasyon zamanı nedeniyle tercih edilmektedir [157].

- **Dendimerler**

Dendimerler ağaç benzeri dallı yapıya sahip ve bu dallanma uçlarında negatif, pozitif veya nötral fonksiyonel gruplar içeren polimerik yapıda nanopartiküllerdir (Şekil 2.17). Suda çözünabilir özelliğe sahiplerdir. İlaçlar bu dallanmalara hidrojen bağları ile, hidrofobik etkileşimlerle, iyonik etkileşimlerle ve kovalent bağ konjugasyonu ile bağlanabilirler. Poliamidoamin (PAMAM) dendimerleri ilaç taşıyıcı sistemleri olarak en sık kullanılan dendimer tipi olup 10 nm'nin altında sentezi mümkün olabilmektedir. Fakat yapılan perioküler enjeksiyon çalışmalarında hızlıca gözden elemine olduğu görüldüğü için 200 nm 'nin üzeri önerilmektedir [158].



Şekil 2.17 Dendimer nanopartiküllerin şematik görünümü [159]

- **Kitozan Nanopartiküller**

Kitozan pozitif yüzey yüküne sahip bir polisakkarit yapıda polimer olup mukoadezyon özelliğinin yüksek olması ve göz yüzeyinde uzun süre kalması nedeniyle topikal uygulamalarda tercih edilen bir polimerik nanopartikül olarak karşımıza çıkmaktadır [160]. Polisakkarit yapısındaki hidroksil grupları sayesinde doku yüzeyindeki su ile etkileşime girerek dokulara yapışma sağlanır. Gözün arka segment hastalıklarının tedavisinde kullanımı sınırlı olmakla beraber yapılan çalışmalarda hibrit PLGA-kitozan nanopartiküllere yüklenen plazmidlerin göze uygulama sonrası RPE tarafından içeri alındığı ve tedaviden 72 saat sonra inflamatuvar sitokinlerin salınımını bloke ettiği gösterilmiştir [161].

- **Protein Nanopartiküller**

Endojen bir protein olduğu için albumin protein nanopartiküllerin sentezinde kullanılan ana proteindir. Meme kanseri tedavisinde Paclitaxel albumin

nanopartikülleri FDA tarafından onay verilmiş bir ajan olup klinik kullanımdadır. İnsan serum albumin ilaçların çözünürlüğünü arttırdığı, toksisitelerini azalttığı, oksidasyona karşı koruduğu ve ilaç yarılanma zamanını uzattığı için ideal bir materyal olarak tercih edilmektedir. Göz sıvılarında (aköz) plazmadan filtre edilerek geçen, en yüksek konsantrasyonda bulunan protein olduğu için ilaç taşıyıcı system olarak önemli bir aday olarak ön plana çıkmaktadır [18].

- **Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanma Metodları**

Polimerik nanopartikül sentezleme yöntemleri değişik tiplerde olmakla beraber kullanılan polimerin yapısına ve etken maddenin çözünürlüğüne göre farklı yöntemler kullanılabilir. Polimerik nanopartiküllerin sentezinde kullanılan yöntemler aşağıdaki gibidir;

- **Solvent (Çözücü) Buharlaştırma yöntemi**

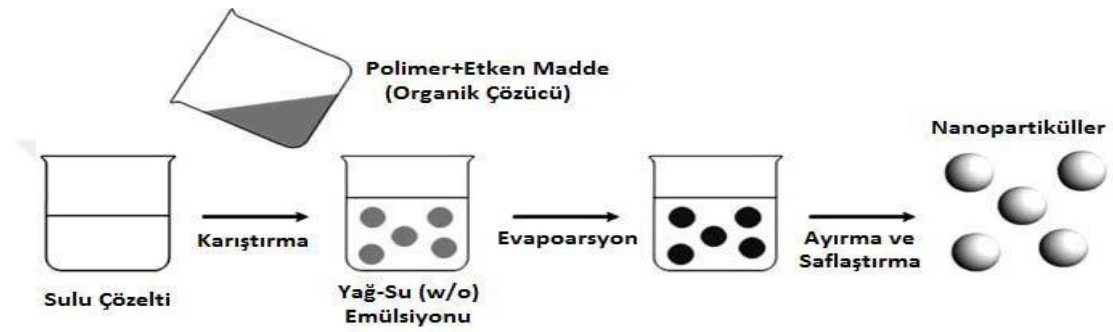
Solvent buharlaştırma yöntemi polimerik nanopartiküllerin sentezinde kullanmak üzere geliştirilen ilk yöntem olup aynı zamanda en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde öncelikle polimerler organik çözücüler içinde çözündürülerek sulu faz ile karıştırılarak emülsiyon oluşturulur. Çözücü olarak kloroform, diklorometan ve asetat gibi çözücüler kullanılmaktadır. Daha sonra emülsiyon içerisindeki polimerleri çözmek için kullanılan çözücülerin buharlaşması için beklenir ve nanopartikül çökeltilerinin geride kalması sağlanır. Elde edilen nanopartiküller santrifüjleme ve distile su ile yıkama aracılığıyla stabilizatör ve nanopartiküle yüklenememiş etken maddelerden uzaklaştırılır. Çözücü buharlaştırma yöntemi olarak iki ana yöntem bulunmaktadır;

- Tekli Emülsiyon Buharlaştırma Yöntemi (Yağ/su)
- İkili Emülsiyon Buharlaştırma yöntemi (Yağ/Su/Yağ)

- **Tekli Emülsiyon Buharlaştırma Yöntemi (Yağ/Su)**

Bu yöntem ile suda çözünmeyen polimer ve etken madde ortak bir çözücüde çözündürülür(Şekl 2.18). Bu nedenle bu yöntem ile hidrofobik ilaçların çözünmesi

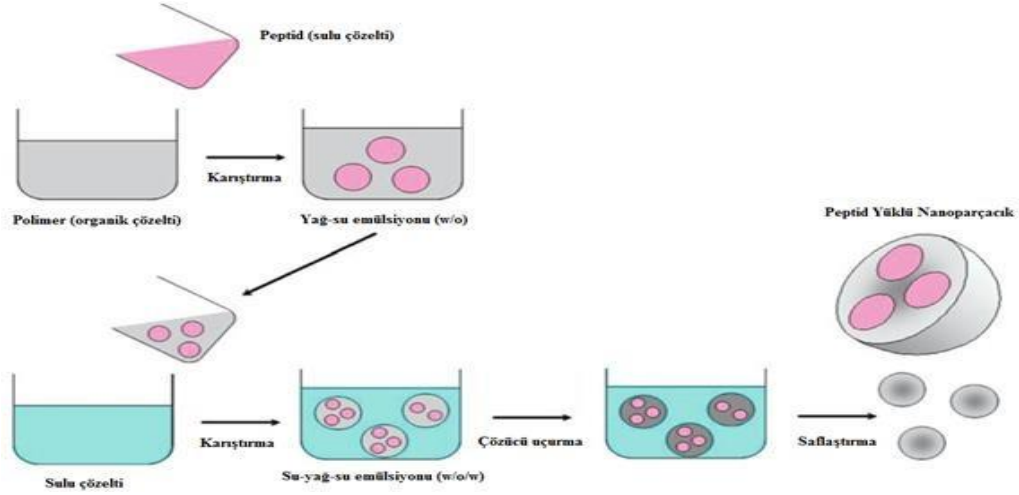
sağlanmış olunur. Çözünme sağlandıktan sonra yüksek hızda homojenizasyon ya da sonikasyon ile emülsiyon haline getirilir. Takiben amfililik makromoleküller yardımı ile yağ/su emülsiyonu oluşturmak için sulu bir çözelti içerisine eklenir. Katı nanopartikülleri oluşturmak üzere çözücü evaporasyonu sağlanır. Elde edilen nanopartiküllerin saflaştırılması için santrifüj ile yıkama yöntemine geçilir ve liyofilizasyon ile nanopartikül katı halde elde edilmiş olunur. Bu yöntem genellikle polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılır [162-164].



Şekil 2.18 Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile polimerik nanopartikül üretimi [165]

- **İkili Emülsiyon Buharlaştırma Yöntemi (Yağ/Su/Yağ)**

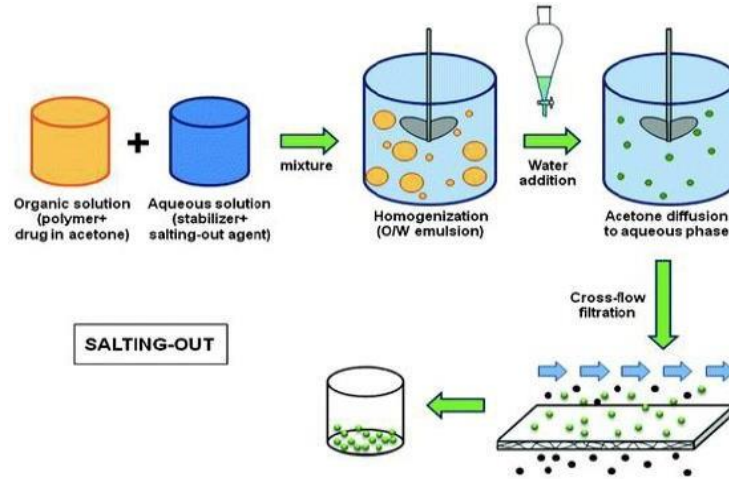
Bu yöntemle hidrofilik yapıda ilaçların, peptid ve proteinlerin yüklendiği polimerik nanopartikül sistemler sentezlenmektedir. Öncelikle suda çözünen ilaçlar polimerin çözündüğü organik fazla yağ/su emülsiyonu haline getirilir (Şekil 2.19). Elde edilen emülsiyon dış sulu fazla tekrar ultrasonikasyonla emülsifiye edilerek yağ/su/yağ emülsiyonu elde edilir. Daha sonra evaporasyon ve ekstraksiyon yöntemleri ile organik faz uzaklaştırılarak katı nanopartiküller elde edilir. Liyofilizasyon ile kurumaya bırakılır [162][166-168].



Şekil 2.19 İkili emülsiyon yöntemi ile Nanopatikül üretimi [165]

- **Tuzla Çöktürme /Salting-Out**

Polimerik nanopartiküllerin üretilmesinde kullanılan diğer bir yöntem tuzla çöktürme yöntemidir(Şekil 2.20). Bu yöntemde polimer çözücüsü olarak aseton gibi organik çözücüler kullanılır. Polimer çözeltisinin sulu fazda emülsiyonlaştırması için içerisinde magnezyum klorür, kalsiyum klorür gibi elektrolitler içeren polivinilpirolidon stabilizatörü kullanılır. Daha sonra çözücü difüzyon yöntemleri ile uzaklaştırılır ve nanopartiküller elde edilir [168,169].



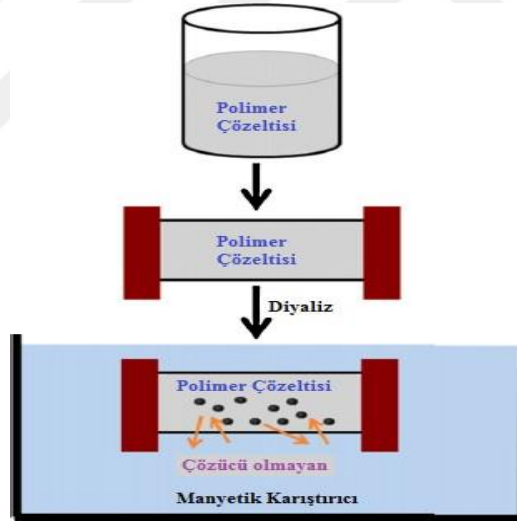
Şekil 2.20 Tuzla çöktürme yöntemi [170]

- **Nano Çöktürme Yöntemi (Çözücü Yer Değiştirme Yöntemi)**

Fessi ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem çözücünün yer değiştirmesi olarak da adlandırılmaktadır [171]. Temel prensip çözelti içerisindeki yarı polar olan çözücünün yer değiştirmesi sonucu bir polimerin ara yüzeyde biriktirilmesine dayanır. Çözücü olarak sıklıkla aseton kullanılmaktadır.

- **Diyaliz**

Bu yöntem küçük boyutta ve boyut dağılımı aralığı dar olan nanopartiküllerin sentezi için kullanılmaktadır. Polimer organik bir çözücü içerisinde çözülür ve uygun bir molekül ağırlığına sahip diyaliz membran bulunan diyaliz tüpünün içine aktarılır(Şekil 2.21). Diyaliz sonucunda polimer çözünürlüğünü kaybeder ve birikmeye başlar, böylece diyaliz sonucunda homojen nanopartikül süspansiyonu elde edilmiş olur [172].



Şekil 2.21 Diyaliz yöntemi ile polimerik nanopartikül oluşumunun şematik olarak gösterimi [172]

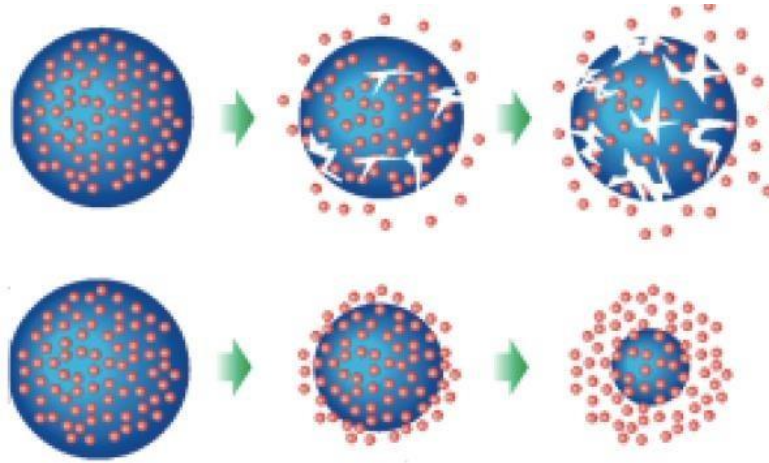
- **Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Süperkritik Akışkan Metodu**

Bu yöntemde nanopartiküllerin eldesi için süper kritik sıvılar kullanılmaktadır. Bu yöntemle polimerik nanopartiküllerin oluşturulması için her hangi bir organik

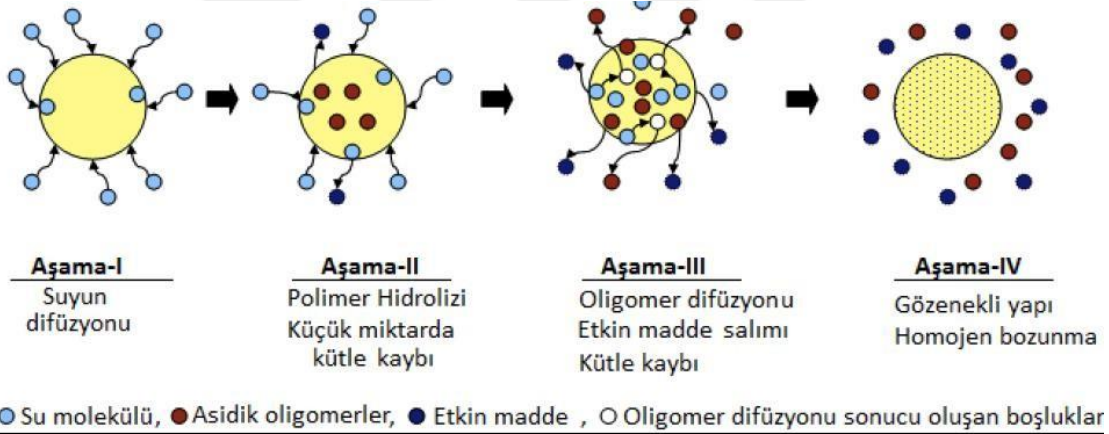
çözücü gerekmemektedir. Fakat üretilen ürünler nanoboyutta olmayıp mikro boyutlarda elde edilir [173,174].

- **Polimerik Nanopartiküllerin İlaç Salım Mekanizmaları**

Polimerik nanopartiküller hedeflendiği dokuya ulaştıktan sonra yapılarındaki yüklenmiş ilaç/etken maddeyi biyobozunumlarının gerçekleşmesi ile sürekli bir şekilde salarlar. Polimerik nanopartiküller vücutta yığın erezyonu ve yüzey erezyonu olmak üzere iki şekilde parçalanmaktadır(Şekil 2.22). Yüzey erezyonunda polimer dış ortama temas yüzeyinden başlayarak bozunmaya başlar ve erezyon kinetiği ile ilaç salımına müdahale edilebilir. Nanopartikül yapısındaki ilaç salımı ise dört aşamada meydana gelmektedir(Şekil 2.23). İlk aşamada suyun difüzyonu gerçekleşmektedir. İkinci aşamada ise suyun difüzyonu ile asidik uçlara sahip polimerlerin hidrolizi ve kütle kaybının başlaması, üçüncü aşamada hidrolize olan boşluklara suyun teması ile kütle kaybının hızlanması ve ilaç salımında keskin artış meydana gelmektedir. Dördüncü aşamada ise polimerik ana madde gözenekli bir yapıya dönüşerek yavaş ve homojen bir şekilde bozunma devam etmektedir [175]. İlaçların polimer matriksinden polimerlerin serbest halde bulunduğu ortama salımı difüzyon yahut ozmotik pompa ile gerçekleşmektedir. Salım hızını ise biyobozunur polimerin bozunması sırasında yapısında oluşan porlardan gerçekleşen ilaç difüzyon hızı belirler. Biyobozunma ile birlikte porlar genişler ve daha çok ilaç difüzyonu olarak ilaç salım hızı artar. Biyobozunur olmayan polimer matrikslerde ise ilaç polimerin yüzeyine doğru ilerler ve gene difüzyon ile ortama salınır. Bu sistemlerde ilaç salım hızı biyobozunur sistemlerden farklı olarak sabittir [176,177].



Şekil 2.22 Polimerik nanopartiküllerin yığın erezyonu ve yüzey erezyonu şeklinde bozunması [178]



Şekil 2.23 PLGA Polimerik nanopartiküllerin bozunma ve ilaç salım aşamaları [175]

Klasik ilaç salım mekanizmaları dışında dış faktörlerin etkisi ile uyarılabilen ilaç salım mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu tip ilaç salım mekanizmaları uyarılmış ilaç salım mekanizmaları ve sıcaklığa duyarlı ilaç salım mekanizması olmak üzere iki grupta incelenebilir.

- **Uyarılmış İlaç Salımı**

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerinde ilaç salımı dışsal ve içsel bir takım uyarılar tarafından gerçekleştirilmektedir. Dışsal uyarılar sıcaklık, ısı ve ultrason gibi faktörler iken , içsel uyarıları enzim, pH, oksidasyon gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin varlığı gözetilerek polimerik nanopartiküllerin hedeflenen dokudaki davranışı ayarlanabilmektedir. Bu tip nanopartiküllere ise uyarıcıya duyarlı (stimuli-responsive) polimerik nanopartiküller denilmektedir. Uyarı sonucunda mevcut nanopartiküllerin kimyasal, biyokimyasal veya fiziksel yollarla yapısında veya kimyasında değişiklikler meydana gelir ve bu değişiklikler sonrasında yapılarındaki etken/ilâç serbest bırakırlar [177].

- **Sıcaklığa Duyarlı İlaç Salımı**

Sıcaklığa duyarlı polimerler, ısıya yanıt olarak fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirirler ve böylece yapılarındaki etken/ilâç salımını gerçekleştirmiş olurlar. Mevcut sıcaklık değişimi dokuların kendi içsel yapılarından kaynaklanabileceği gibi dışsal olarak dış bir kaynak tarafından da kaynaklanabilir. Sıcaklık ile oluşan ilaç salım durumlarında sıcaklığın etkisi ile polimerin hidrasyon durumunda değişiklik olmaktadır bu durum ilaç salımını tetiklemektedir. Sıcaklıktan etkilenen polimerler belli bir sıcaklığın altında hidrofilik iken daha yüksek sıcaklıklarda hidrofobik yapı gösterirler. Bu kritik sıcaklığa alt kritik çözelti sıcaklığı (LCST) denilmektedir. LCST'nin altında, polimerler, uzun bir zincir konformasyonu (çözünür) hidratlanır ve daha üst sıcaklıklarda ise çökmüş bir zincir konformasyonu ile dehidre halde bulunurlar. Nanotaşıyıcı sistemlerde bu sıcaklık değişimi ile polimerler ya hastalıklı bölgedeki iç sıcaklık değişimlerine ya da dışsal olarak uygulanan ısıya yanıt olarak, hidrasyon halindeki ve hacmindeki bir değişiklik ile yüklerini serbest bırakırlar. Nanotaşıyıcıların tepki verdiği sıcaklık aralığı, oluşturan polimerin hidrofilik ve hidrofobik kısımları arasındaki oransal denge ayarlanarak hedeflenen düzeyde değiştirilebilir. Sıcaklığa tepki veren bir nanotaşıyıcının yükünü serbest bırakması gereken ideal aralık, protein denatürasyonu önlemek ve denatürasyona bağlı toksik etkileri en aza indirmek için 37 ila 42 ° C arasındadır [177],[181].

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

- Hava akımlı kabinler (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BHEN 2006)
- Karbondioksitli inkübatör (New Brunswick scientific CO-150 37°C,
- Ters mikroskop (Olympus CKX41)
- Santrifüj (Eppendorf, Thermo Micromax RF)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR3000)
- pH metre (HANNA instruments)
- Hassas terazi (Precisa Gravimetrics AG)
- Buz makinesi (Scotsman AF100)
- Vortex (LMS(laboratuvarı medical supplies) VTX-3000L)
- Su banyosu (GFL (gesselschaft für labortechnik) mbH, Kerman)
- Dondurucular (Beko(+4,-20°C), Arçelik(+4,-20°C), GFL(-40°C))
- -197 °C azot tankı ve azot taşıma tankları (DMC air liquid systems)
- Otoklav (Kerman, HIRAYAMA)
- UV-spektrofotometre (Jasco V-530)
- ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)
- Saf su ve ultra saf su sistemleri (GFL2104)
- Mikropipetler (10, 100 ve 1000 µl'lik ,Thermo, Pippetman)
- Pipet uçları (1-10, 20-200, 100-1000 µl'lik tek kullanımlık, AxyGen)

- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml. (Eppendorf, IsoLAB)
- ELISA 96 kuyulu plakları (TPP)
- Hücre kültürü plakları (TPP)
- Hücre kültür flaskları 25 ve 75 cm² (TPP, Corning)
- Serolojik pipet tabancası (Thermo)
- Serolojik pipetler 1,5,10 ml (Blau Brand Germany)
- Steril pastör pipeti 3 ml (LP ITALIANA SPA)
- Kriyotüpler (TPP)
- Süzgeç (BD Falcon)
- Otoklavlanabilir cam şişeler 50-1000ml'lik (ISOLAB, SCHOTT)
- Thoma lamı hücre sayımı için (Menzel superior)
- Enjektörler 1, 5, 10 ve 50 cc'lik (Ayset)
- Şırınga filtreleri 0,22 µm ve 0,45 µm'lik (MILLIPORE, TPP, Sartorius)
- 0.2 µm Nitroselüloz Membran (GE Healthcare Life Sciences, Amersham Protran Premium)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM)
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR)
- Sonikatör
- Liyofilizatör

3.1.2 Kimyasallar

- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Sodyum bikarbonat, NaHCO₃ (Merck)
- Etanol (Merck)
- Potasyum hidroksit, KOH (Merck)
- Dipotasyum fosfat, K₂HPO₄ (Sigma)

- Monopotasyum fosfat, KH_2PO_4 (Sigma) Sodyum dihidrojen fosfat mono hidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- Tween-20 (MP Biomedicals LLC)
- FBS-fetal bovine serum (PAN Biotech)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (AppliChem)
- Gentamisin (GIBCO)
- Penisillin-streptomisin (PAN Biotech)
- Polivinilalkol (PVA; (average MW 30,000–70,000)
- Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA ; LA/GA=50/50, Mn= 38.000-50,000)
- Diklorometan (DCM) (Sigma)
- Aflibercept (Eylea) (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.,Tarrytown, NY; and Bayer Health Care Pharmaceuticals)
- Tripan mavisi (Biological Industry)
- Thylazoyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma)
- Tiripsin (PAN Biotech)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium- F12 (DMEM –F12) (PAN Biotech)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (PAN Biotech)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM-High) (GIBCO)

3.2 Deneylerde Kullanılan Besiyerleri, Tampon ve Kimyasalların Hazırlanması

3.2.1 Tamponlar

- **PBS Tamponu**

NaKL 8 gr, 0,2 gr KH₂PO₄, 1,8 gr Na₂HPO₄.2H₂O ve 2 gr KKL hassas terazide tartıldı. Üzerine 900 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile maddelerin çözülmesi sağlandı. Ph metre ile pH ölçüldü ve pH'ı 7,4'e ayarlanacak şekilde son hacim 1000 ml olacak şekilde solüsyon hacmi tamamlandı. Takibinde sterilizasyon amaçlı otoklavlama yapılarak kullanım için +4 C⁰ saklandı.

- **Tripan Mavisi**

Hücrelerin canlılık tayini için % 10 tripan mavisi boya distile su ile hazırlandı.

- **MTT Solüsyonu**

MTT tuzu 10 mg/ml PBS içerisinde hazırlanıp vortekslendi, Önce 0,45 µl' lik filtreden ve daha sonra 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edilip -20 e kaldırıldı.

3.2.2 Besiyerleri

- **Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

Hücrelerin dondurma solüsyonu %90 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) 10 ml olacak şekilde, 15 ml'lik falkonlarda hazırlandı ve -20°C saklandı.

- **Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu**

%10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması için 50'lik falkona 45 ml besiyeri alınıp 0.5 ml penisilin-streptomisin ve 5ml FBS ile tamamlandı.

- **Yüksek Glukozlu Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu**

%10 FBS içeren DMEM High besiyerinin hazırlanması için 50'lik falkona 45 ml besiyeri alınıp 0.5 ml penisilin-streptomisin ve 5ml FBS ile tamamlandı.

3.2.3 Nanotaşıyıcı Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

- **%1.5 PLGA 'nin Hazırlanması**

Nanopartiküllerin üretiminde %1.5 PLGA hazırlanması için 33.3 mg PLGA tartılıp üzerine 2ml DCM (diklorometan) eklendi.

- **%1 PVA'nın Hazırlanması**

Bunun için 1 mg PVA tartılıp üzeri 100 ml distile su ile tamamlandı. Ardından 50°C sıcaklıkta 600 rpm'de karıştırılarak çözdürüldü.

- **Kapsülasyon İçin Aflibercept Hazırlanması**

Aflibercept 25 mikrolitre(μ l), 1ml distile suda çözüldü.

3.3 Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

3.3.1 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilecek numune metal plakların üzerine karbon bantlar yapıştırıldıktan sonra, karbon bantların üzerine ince bir tabaka halinde yerleştirilir. Ardından altın veya platin ile kaplanır. Takibinde yüzey morfoloji ve boyut gözlemlenir. Nanopartiküllerin morfolojisi farklı boyutlarda incelenebilir [179].

3.3.2 Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Analitik bir teknik olarak bilinen fourier dönüşümlü-infrared spektroskopi (FTIR), organik (bazı durumlarda inorganik) malzemelerin tanımlanması için kullanılan bir yöntemdir. Maddenin soğurma ve emisyon kızılötesi spektrumunun elde edildiği bir spektroskopi tekniğidir. 1500 - 400 cm^{-1} bölgesine parmak izi bölgesi olarak tanımlanır ve her bir malzeme için ayrı bir bulgu gösterir [180].

3.3.3 Zeta Sizer

Zeta sizer, sıvı bir ortamda bulunan suda çözünen ya da çözünmeyen dispersiyonların parçacık boyutu, zeta potansiyeli ve molekül ağırlığı ölçümünü yapabilen bir cihazdır. Sıvı ortamda yüzen parçacıklar, çözücü moleküllerin rastgele hareketi sonucu brown hareketi yaparlar. Dynamic Light Scattering (DLS) tekniği kullanılarak brown hareketinin hızı ölçülür ve parçacık boyutu belirlenir [180].

3.3.4 UV-Vis Spektroskopisi

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi bir örnekten geçtikten veya bir örnek tarafından bir ışın demetinin yansıtıldıktan sonra ışının azalmasının ölçülmesidir. Işının şiddetinin azalması absorpsiyonun arttığını gösterir. Derişimi, belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerek bulunur. UV-Vis spektroskopisi genellikle çözeltideki maddelerin konsantrasyonlarının belirlenmesinde ve ölçümünde kullanılır [180].

3.4 Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA-Aflibercept nanopartikülleri ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı [181]. 33.3 mg of PLGA 2 ml of DCM içinde çözüldü ve 1,5 % lik polimer çözeltisi elde edildi. 2 mg (50 mikrolitre) Aflibercept solüsyonu distile su ile karıştırılarak 1 ml'ye tamamlandı. 1 ml DCM de çözülmüş PLGA solüsyonu ile 1 ml Aflibercept solüsyonu karıştırılarak buz kuvetinde 5 dk sonikasyona tabi tutuldu. Ardından 1% hazırlanmış PVA solüsyonuna manyetik karıştırıcı eşliğinde damlatılarak karıştırıldı ve tekrardan buz havuzunda sonikasyona tabi tutuldu. Elde edilen emülsiyon 8000 rpm devirde +4 C⁰ de 30 dk santrifüj uygulandı. Aynı işlem 3 kez tekrarlanarak nanopartiküllerin serbest ilaç ve diğer artık maddelerden yıkanması sağlandı. Elde edilen pellet 15 ml distile su ile pipetaj uygulanarak tekrar emülsiyeye hale getirildi. Elde edilen süpernatantlar +4 C⁰

saklandı. Elde edilen nanopartiküllerden zeta sizer cihazı ile boyut ve yüzey yükü değerlendirilmesi amacıyla örnekler alındı. En son aşamada elde edilen örneklere kurutulmak amacıyla liyofilizasyon işlemi uygulanarak partikül karakterizasyonu için -20 C⁰ saklandı. Aynı sentez prosesi Aflibercept eklenmesi olmadan boş PLGA nanopartikülü sentezi için de uygulandı.

3.5 Aflibercept Yüklenmiş PLGA Nanopartiküllerinin

Karakterizasyonu

3.5.1 Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Partikül boyutu ve polidispersite indeksi, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Malvern, BK) kullanılarak foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ile tanımlandı. Ölçümlerin gerçekleşmesi için nanopartiküller distile suda 1:10 oranında seyreltildi. Boyut ölçümleri, 25 ° C'de 0.5 / 100 (h / h) oranında damıtılmış suda seyreltilerek nanopartikül süspansiyonlarının hazırlanmasının ardından gerçekleştirildi. Polidispersite indeksi aralığı 0 ile 1 arasında değerlendirildi. Sentezlenmiş nanopartiküllerin zeta potansiyelleri (□) aynı alet kullanılarak 25 ° C'de ölçüldü.

3.5.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Kurutulmuş nanopartiküller, çift taraflı yapışkan karbon bantlar bant kullanılarak ince bir film halinde metal plaklara yerleştirildi. Takiben vakum altında altınla kaplandı. Parçacıklar, 10–20 kV gittikçe artan voltajda Evo LS10 (ZeissEVO LS 10, Almanya) taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak görüntülendi.

3.5.3 Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) spektrumları, zayıflatılmış toplam yansıtma tekniği ile IR-Prestige 21 (Shimadzu, Japonya) kullanılarak toplanmıştır. PLGA, Aflibercept ve Aflibercept yüklü nanopartikül (NP)'lerin FTIR

spektrumu 600 ila 4000 cm^{-1} 'lik bir bölgede gerçekleştirildi. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte 16 kez taranarak ölçüldü.

3.6 DeneYlerde Kullanılan Hücre Hatları

3.6.1 Hücre Kültürü Metotları

- **Hücre Kültürünün Yapılması ve Kriyoprezervasyonu**

Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik bölümü hücre kültürü ve doku mühendisliği laboratuvarında sıvı azot tankında bulunan hücreler çıkarılıp 37°C su banyosunda çalkalanarak çözündürüldü. Çözünen hücre tüpe alınarak üzerine uygun besiyeri 5 ml %10 FBS'li DMEM-F12 veya DMEM-High eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril pastör pipeti ile alındıktan sonra hücre pelleti besiyeri ile 1 ml tamamlandı; ardından hücre sayımı yapıp flaslara ekimi gerçekleştirildi [182].

- **Hücrelerin Kriyoprezervasyonu**

Hücrelerin kriyoprezervasyonu için kriyoprotektan %20 (FBS ve DMSO) ile hazırlandı 1 ml kriyotüpe 50:50 oranında hücre ve kriyoprotektan eklenerek yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu [182].

- **Kriyobanktan Hücrelerin Çıkarılması ve Kültürünün Yapılması**

Hücreleri kriyobanktan çıkarılması için 37°C su banyosunda yavaş çözülmeye bırakıldı. %10 FBS içeren besiyerine aktarıldı, ardından santrifüj edilerek süpernatantı atılıp hücre pelleti besiyeri içeren flaslara aktarıldı [182].

- **Hücre Kültürünün Tripsinizasyonu**

Hücreler yüksek oranda proliferasyonu görüldükten sonra tripsin enzimi ile pasajı yapılarak flask yüzeyinden kaldırıldı. Bunun için flask yüzeyi PBS ile yıkanır ardından belli miktarda tripsin eklenerek 5 dk 37°C etüvde inkübe edilir. Hücrelerin kalkması invert mikroskopda incelenir, tamamen flask yüzeyinden

kalktıktan sonra üzerine 2 ml %10 FBS içeren besiyeri eklenir ve 15'lik falkona alınarak santrifüj edilip tekrardan ekimi gerçekleşir [182].

- **Hücrelerin Sayımı**

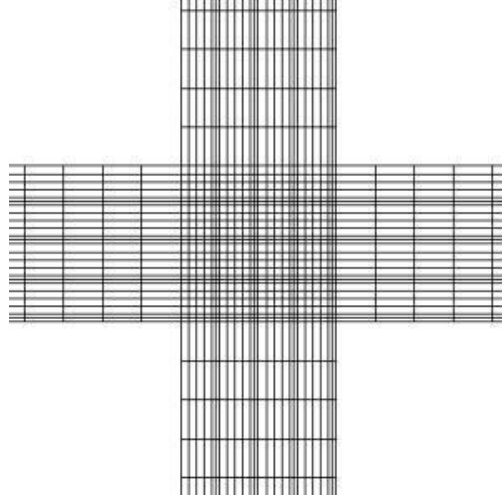
Santrifüj sonrası hücrelerin sayımı için deneyi veya pasajı yapılacak hücreler önce santrifüj edildi, hücre pelletin yüzeyinde bulunan süpernatant atıldı geride kalan hücre süspansiyonunun üzerine hücre hattına uygun besiyerinden damlatıldı toplam hacmi 1,0 ml olacak şekilde tamamlandı. Hazırlanmış hücre süspansiyonundan hücrelerinin sayımı için iki farklı ependorf tüpüne Daha sonra ise üzerine 48µl PBS ve 50 µl, tripan mavisini solüsyonundan ve 2 µl hücre alındı, iyice pipetaj yapıldı. Thoma lamının (Şekil 3.1) iki tarafına boyanmış hücre süspansiyonundan lamelin kenarı boyunca yüklendi, mikroskopta incelendi ve hücre sayımı gerçekleştirildi [182].

Hücre sayısı (1ml): Ortalama canlı hücre sayısı x Sulandırma katsayısı x Thoma lamı Sabiti(10,000)

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamının alt ve üst kısımlarında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

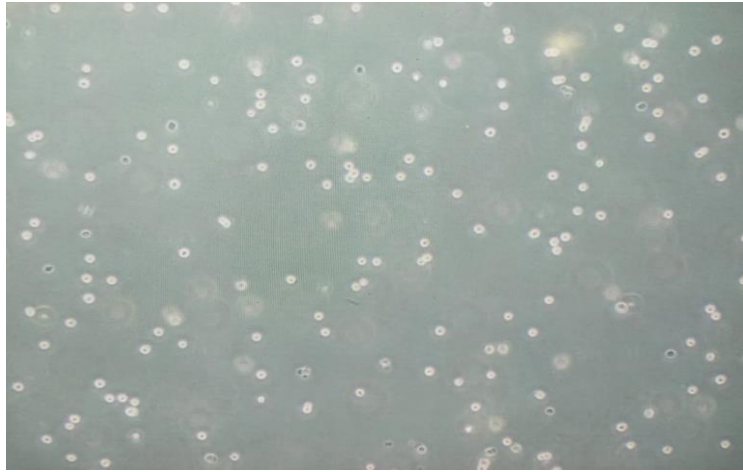
Thoma lamı sabiti: 10.000



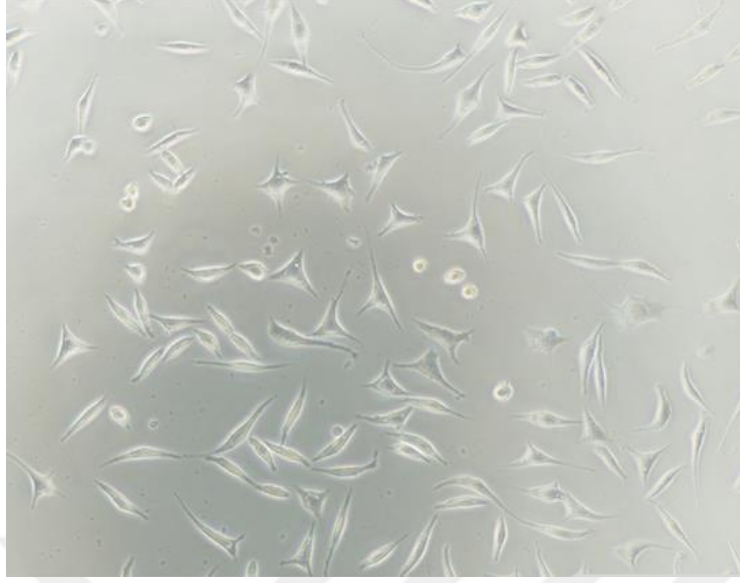
Şekil 3.1 Thoma lamı üzerindeki çizgiler

3.6.2 İnsan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) ve Retinal Vasküler Endotelial Hücrelerinin (RVECs/HREC) Kültürünün Yapılması

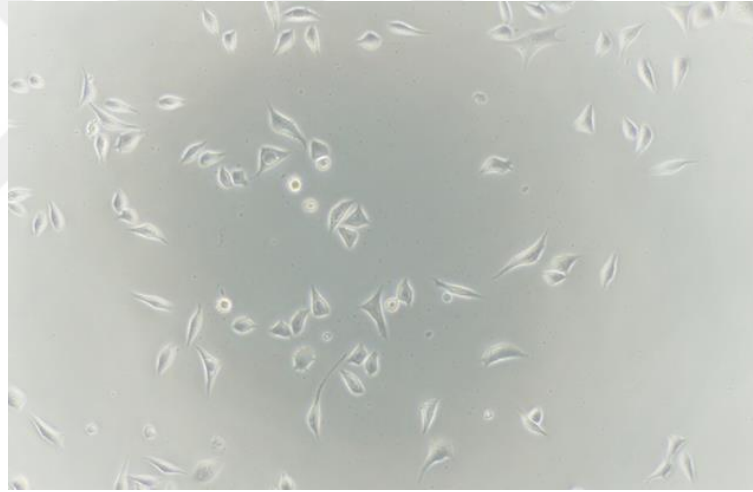
Bu aşamada kriyobankta bulunan hücrelerin kültürü %10 FBS içeren DMEM-F12 ve DMEM-High ile başlatıldı. T25 lik flasklarda 4ml besiyeri içerisinde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi (Şekil 3.2). Her 24 saatte hücrelerin invert mikroskopta morfolojisi ve proliferasyonu incelendi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.2 Kriyobank sonrası hücrelerin kültürünün yapılması (X10)



Şekil 3.3 ARPE-19 hücrelerin ekim sonrası inverted mikroskopta görünümü (x10)

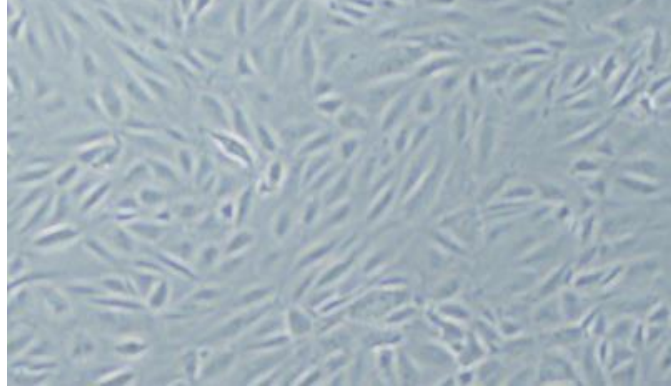


Şekil 3.4 RVECs hücrelerinin ekim sonrası inverted mikroskopta görünümü (x10)

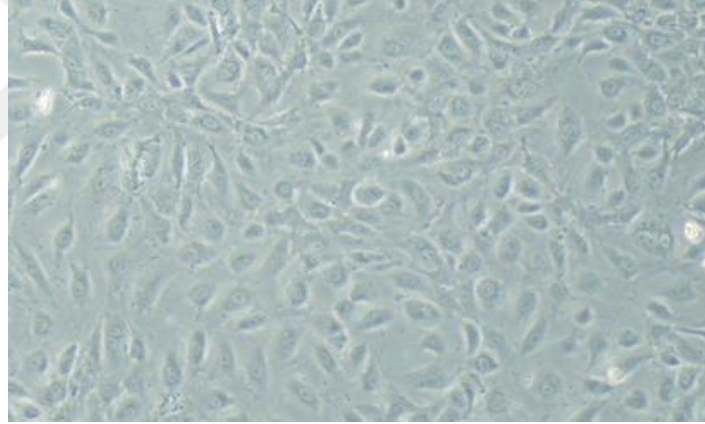
3.6.3 İnsan Retina Pigment Epiteli (ARPE-19) ve Retinal Vasküler Endotelial Hücrelerinin (RVECs/HREC) Pasajının Yapılması

T25' lik flasklarda olan hücreler %90 çoğalma miktarına varduktan sonra hücrelerin tripsinizasyonu amaçlı T25 flasklarda olan hücreler 2 ml PBS (fosfat buffer) ile yıkandı. Daha sonra 1 ml tripsin enzimi eklenip 5 dakika %5 CO₂ içeren 37 C⁰ derece inkübatörde bekletildi. Takibinde eklenen tripsin enziminin iki katı olacak şekilde besiyeri eklenip 5dk, 1000 rpm' de yıkama işlemi gerçekleştirildi

ardından hücre sayımı yapıp T25 flasklara 400,000 hücre olacak şekilde 5 ml besi yerine tekrar ekim yapıldı.



Şekil 3.5 ARPE-19 hücrelerinin pasajlama öncesi mikroskopik görüntüsü (X10)



Şekil 3.6 RVECs hücrelerinin pasajlama öncesi mikroskopik görüntüsü (X10)

3.6.4 Hücre Hatlarının Kriyoprezervasyonu

ARPE-19 ve RVECs hücre hatları kriyoprezervasyonu için %20' lik FBS ve DMSO'dan oluşan kriyoprotektan hazırlandı. Pasaj sonrası hücrelerin sayımı yapıldı. 1 ml' lik kriyotüpte 10^6 hücre, 50:50 oranında (hücre/kriyoprotektan) olacak şekilde kriyoprotektan ile hücreler karıştırıldı. Takiben yavaş dondurma

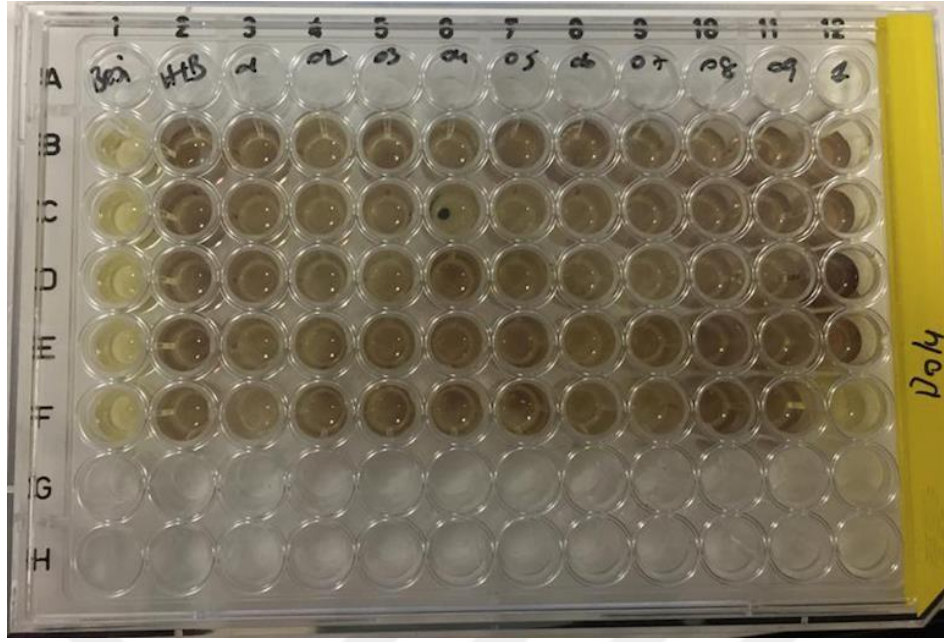
işlemi ile hücreler 1 saat +4'de, 2 saat -20'de ve bir gece -40'da tutularak, -196°C kriyobanka aktarıldı [182].

3.6.5 RVECs Hücre Kültürünün Optimizasyonu

Kriyoprezervasyon sonrası sıvı azottan çıkarılan hücrelerin kültürünün yapılma sırasında hücrelerin yeterli proliferasyon göstermediği ve atipik oldukları tesbit edildi. Bu hücreler flasklardan pasajı yapılarak kaldırıldı ve DMEM- High medyumunda kültüre devam edildi. Hücre proliferasyonunun artması ve daha iyi morfolojik görüntü gözlemlendi.

3.7 Hazırlanan Nanopartiküllerin Hücre Hatları Üzerinde MTT Yöntemi ile Toksikite Tayini

Hücre toksisitesi değerlendirme amaçlı ARPE-19 ve RVECs/HREC hücreleri üzerine boş PLGA ve Aflibercept yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid tuzu (MTT) sitotoksikite testi ile değerlendirildi. Hücreler 96-well plate'e 5000 cells/well olacak şekilde ekildi. 24-48 saat 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek kültüre edildi. Her iki deneyde de 1. Sütun boş besi yeri ve 2. Sütun sadece hücre kültürünün yapıldığı kolon olarak seçildi. 3. stundan itibaren 0.1 µM konsantrasyonda başlamak üzere her bir kolona PLGA nanopartikül / yüklü PLGA(Aflibercept) nanopartikülü artan dozlarda 0.5 µM'a kadar eklendi. 48 saat inkübasyon sonrası 5mg/ml olacak şekilde hazırlanmış MTT solüsyondan 10 µl here kuyuya eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Plakalar mikroskopda incelendi farmazon kristallerinin oluştuğu gözlemlendi. Ardından kristallerin çözünmesi için her kuyuya 100 µl DMSO eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletilip eliza okuyucuda 560 nm ölçümler alındı.



Şekil 3.7 Değişik konsantrasyonlarda MTT testi

3.8 Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA-Aflibercept nanopartikülleri ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandı [181]. 33.3 mg of PLGA 2 ml of DCM içinde çözüldü ve 1,6 % lik PLGA polimer çözeltisi elde edildi. 2 mg (50 mikrolitre) Aflibercept solüsyonu distile su ile karıştırılarak 1 ml'ye tamamlandı. 1 ml DCM de çözülmüş PLGA solüsyonu ile 1 ml Aflibercept solüsyonu karıştırılarak buz kuvetinde 5 dk sonikasyona tabi tutuldu. Ardından 1% hazırlanmış 2 ml PVA solüsyonuna manyetik karıştırıcı eşliğinde damlatılarak karıştırıldı ve tekrardan buz havuzunda sonikasyona tabi tutuldu. Elde edilen emülsiyona 8000 rpm devirde +4 C⁰ de 30 dk santrifüj uygulandı. Aynı işlem 3 kez tekrarlanarak nanopartiküllerin serbest ilaç ve diğer artık maddelerden yıkanması sağlandı. Elde edilen pellet 15 ml distile su ile pipetaj uygulanarak tekrar emülsiyeye hale getirildi. Elde edilen süpernatantlar +4 C⁰ saklandı. Elde edilen nanopartiküllerden zeta sizer cihazı ile boyut ve yüzey yükü değerlendirilmesi amacıyla örnekler alındı. En son aşamada elde edilen örnekler kurutulmak amacıyla liyofilizasyon işlemi uygulanarak partikül karakterizasyonu için -20 C⁰ saklandı. Aynı sentez prosesi Aflibercept eklenmesi olmadan boş PLGA nanopartikülü sentezi için de uygulandı.

3.8.1 Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi

- **Enkapsülasyon Etkinliği (EE) ve İlaç Yükleme Kapasitesi (DL)**

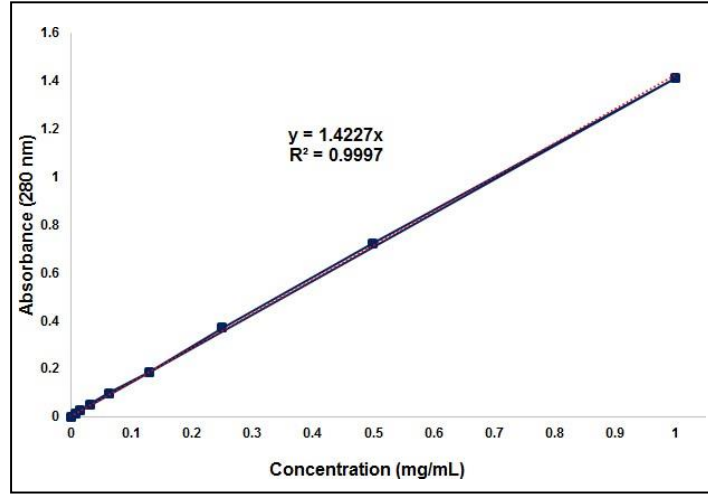
Nanopartikül içindeki enkapsüle Afliberceptin tespiti indirekt kuantifikasyon metodu ile 280 nm 'de UV-Vis spektroskopi kullanılarak yapıldı. Nanopartikül sentezi sırasında toplanan süpernatantlar UV-Vis spektroskopi kullanılarak analiz edildi ve nanopartiküllere yüklenemeyen ilaç miktarı belirlendi. Süpernatantdaki Aflibercept konsantrasyonu daha önce oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak elde edildi. Yüklenen Aflibercept miktarı total Aflibercept ve enkapsüle olmayan Aflibercept miktarlarına göre hesaplandı. Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) aşağıda verilen formüllere göre hesaplandı. Aflibercept konsantrasyonunun fonksiyonel standart absorbans kalibrasyon eğrisi 280 nm de çalışıldı ve tüm denemeler 3 kez gerçekleştirildi.

Enkapsülasyon Etkinliği (%) = Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı(mg)/
Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı X 100

İlaç Yükleme Kapasitesi (%) = Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (mg)/
Elde edilen nanopartikül miktarı (mg) X 100

- **Aflibercept Kalibrasyon Eğrisinin Hazırlanması**

Toplamda sekiz farklı Aflibercept konsantrasyonu, seri seyreltme ile hazırlandı. Her konsantrasyonun UV absorbans değeri, UV - Vis spektrometre ile 280 nm'de belirlendi. Daha sonra kalibrasyon eğrisi elde edildi ve kapsülleme verimliliğini, yükleme kapasitesini ve salım miktarını belirlemek için eğri denklemi kullanıldı.



Şekil 3.8 Afibercept kalibrasyon eğrisi

- **Hazırlanan Nanopartiküllerin Kurutulması**

Hazırlanan nanopartiküller 15 ml lik falkonlarda liyafilizatörde -60 derecede vakumlu alanda yüksek basınç altında 48 saat kurutulmaya bırakıldı.

3.9 **İn vitro İlaç Salım Çalışmaları**

Afibercept yüklü PLGA NP'ler, 1 mL distile su içinde çözüldü ve ilaç molekülünün in vitro salım profilini belirlemek için bir diyaliz kapsülüne yerleştirildi. Salım ortamı olarak normal fizyolojik değerleri simüle etmek için pH 7.4'te fosfat tamponu (PBS) kullanıldı. In vitro salım çalışması 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 ve 48 saat aralıklarında gerçekleştirildi. Örneklerin inkübasyonu, hafifçe çalkalama (60 rpm) altında 37 ° C'de çalkalanan bir su banyosunda gerçekleştirildi. Salım ortamından bir mililitre numune alındı ve bunun yerine aynı hacimde taze salım ortamı eklendi. Örnekler, 280 nm'de UV – Vis spektrometre kullanılarak analiz edildi.

PLGA NP'lerinden salınan Aflibercept miktarı aşağıdaki denklem kullanılarak elde edildi:

$$\text{Salım \%} = \frac{\text{Salıma Uğrayan Aflibercept Miktarı}}{\text{Total Aflibercept Miktarı}} \times 100$$



Şekil 3.9 Diyaliz kapsül içine yerleştirilen nanopartiküllerin salım aşamasındaki görüntüsü

4.1 Aflibercept Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1 Nanopartikül Boyut Dağılımı ve Zeta Potansiyel Analizi

Sentezlenmiş boş nanopartiküllerin yoğunluğu boyutu dağılımı, Z-ortalaması (Z-Ave) ve PDI, 4.0 mV donatılmış bir Zeta sizer cihazı kullanılarak dinamik ışık saçma tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Örnekler, fosfat tampon (PBS) ile seyreltilerek hazırlandı, ölçüm yapılmadan önce bir 0.20 μm RC-membran filtre ile filtrelendi ve tüm ölçümler üç kez gerçekleştirildi. Boş ve Aflibercept yüklenmiş PLGA-Aflibercept nanopartiküllerin zeta dinamik ışık saçılımı (DLS) sonuçları, Tablo 4.1'de sunulmuştur. Yapılan her bir nanopartikül sentez deneyinin sonuçlarına dayalı olarak, boş PLGA nanopartiküllerin Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinden daha küçük olduğu gözlemlendi. Sentezlenen Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerin boyutunun ortalama 262 ± 6.6 nm olduğu görüldü. Tablo 4.1 aynı zamanda boş ve Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinin PDI değerlerini ve zeta potansiyellerini göstermektedir. Ortalama PDI değeri, boş PLGA için 0.035 ± 0.009 ve Aflibercept yüklü PLGA için 0.12 ± 0.01 idi. Bu veriler, sentezlenmiş nanopartiküllerin dar bir boyut dağılım aralığına sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). Boş nanopartiküllerin ortalama zeta potansiyelinin 13.3 ± 9.04 mV olduğu görüldü (Şekil 4.3). PLGA polimerinin karboksil terminal grubunun sentezlenmiş nanopartiküllerin negatif zeta potansiyellerinden sorumlu olduğu gözlemlendi. Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinin ortalama zeta potansiyeli $+ 6.27 \pm 4.97$ mV idi ve bu Aflibercept molekülünün pozitif yüküne atfedildi (Şekil 4.4).

- **Enkapsülasyon Etkinliği (EE) ve İlaç Yükleme Kapasitesi (DL)**

Enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL) aşağıda verilen formüle göre hesaplandı. Aflibercept konsantrasyonunun fonksiyonel standart absorbans kalibrasyon eğrisi 280 nm de çalışıldı ve tüm denemeler 3 kez gerçekleştirildi.

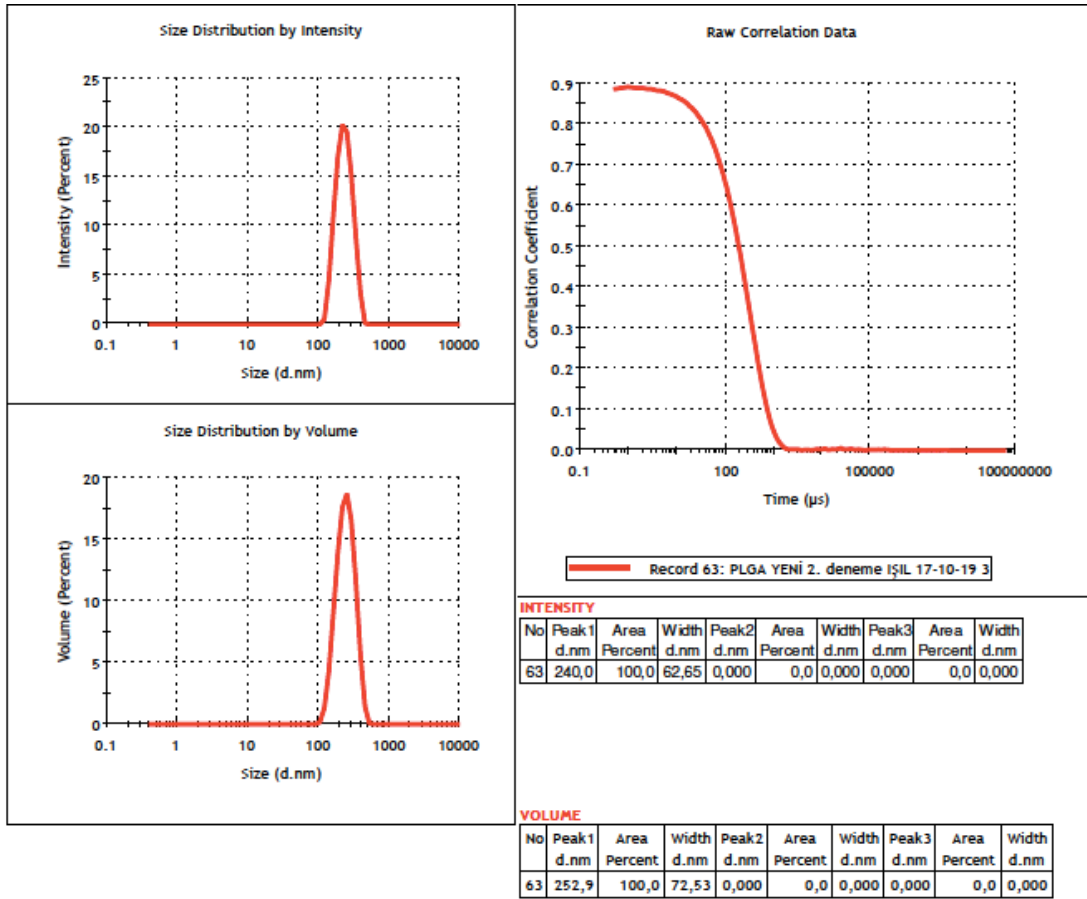
Enkapsülasyon Etkinliği (%) = Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı(mg)/
Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı X 100

İlaç Yükleme Kapasitesi (%) = Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (mg)/
Elde edilen nanopartikül miktarı (mg) X 100

Enkapsülasyon etkinliği (EE%) ve ilaç yükleme kapasitesi (DL%) UV-VIS spektroskopi ile 280 nm de ölçüldü. EE % nin 85.2±1.08 % ve DL% nin ise 10.4±4.5 olduğu tespit edildi (Tablo 4.1).

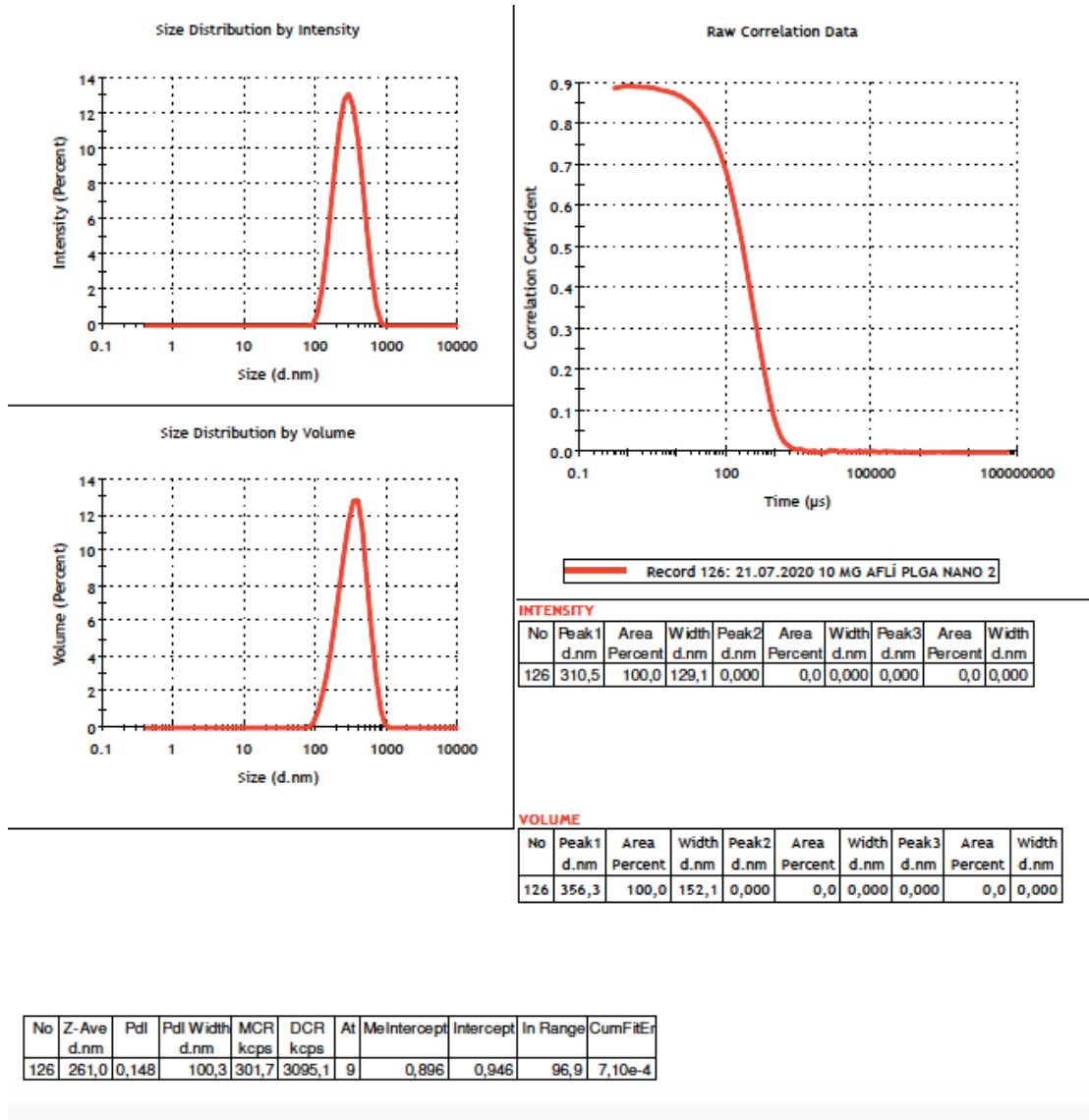
Table 4.1 Partikül karakterizasyonu, Mean Value ± SD

Particle Type	Diameter (nm)	PDI	Zeta (mV/ζ)	%EE	%DL
Blank Nanopartikül	227 ±7.5	0.035±0.009	-13.3±9.04	----	----
Aflibercept yüklü PLGA Nanopartikül	262±6.6	0.12±0.016	6.27±4	85.2±1.08	10.4±4.5



No	Z-Ave d.nm	Pdl	Pdl Width d.nm	MCR kcps	DCR kcps	At	MeIntercept	Intercept	In Range	CumFitEr
63	226,0	0,036	42,67	367,8	1311,7	10	0,893	0,944	96,8	4,44e-4

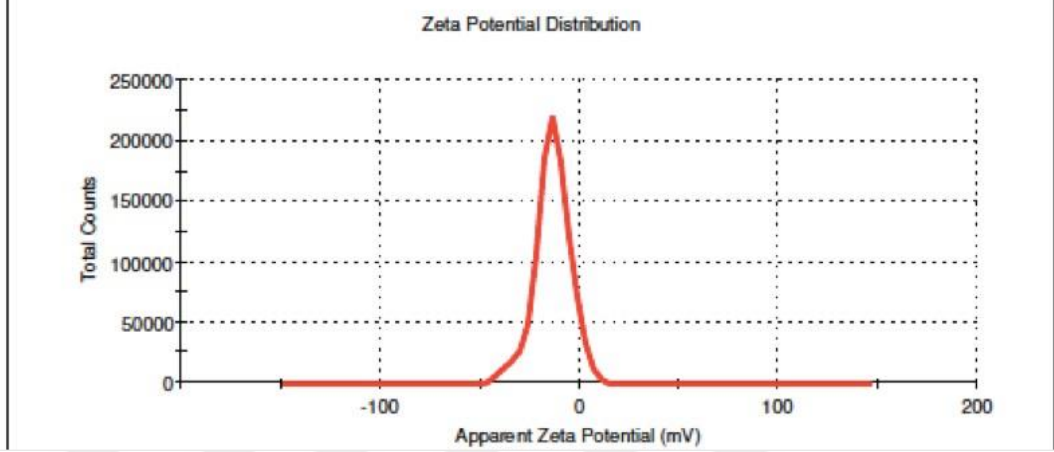
Şekil 4.1 Boş PLGA nanopartikül boyut analiz sonuçları



Şekil 4.2 PLGA-Aflibercept nanopartiküllerinin boyut analiz sonuçları

Results

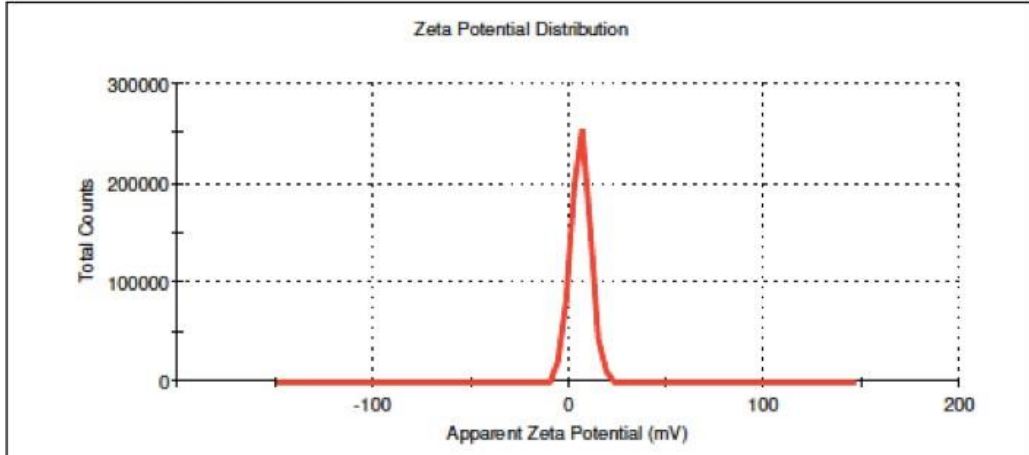
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -13,3	Peak 1: -13,3	100,0	9,04
Zeta Deviation (mV): 9,04	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0142	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



Şekil 4.3 Boş PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiği

Results

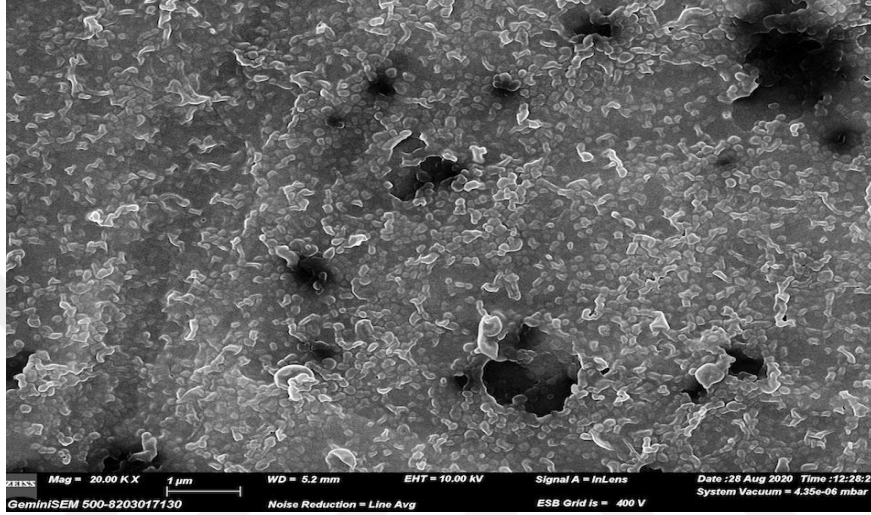
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): 6,27	Peak 1: 6,27	100,0	4,97
Zeta Deviation (mV): 4,97	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0154	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



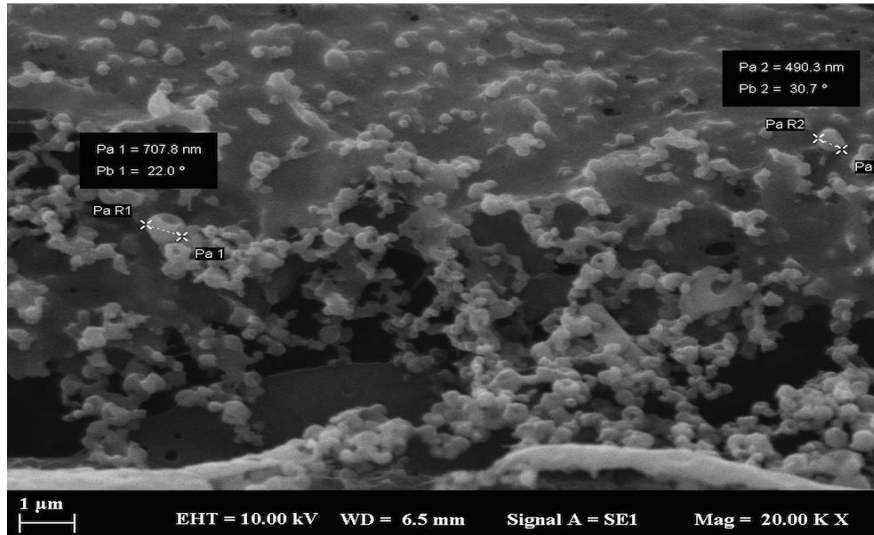
Şekil 4.4 Afibercept yüklü PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyel grafiği

4.1.2 SEM Analizi Sonuçları

Dondurulmuş-kurutulmuş nanopartiküller metalik plateler üzerine ince bir film halinde yapışkan karbon bantlarına tutundurulacak şekilde yerleştirildi. Takiben vakum altında altın kaplama yapıldı. Zeiss GeminiSEM 500 (Zeiss, Germany) SEM ile 10-20 kV değişen voltajlarda görüntüleme alındı(Şekil 4.5 (a),(b)).



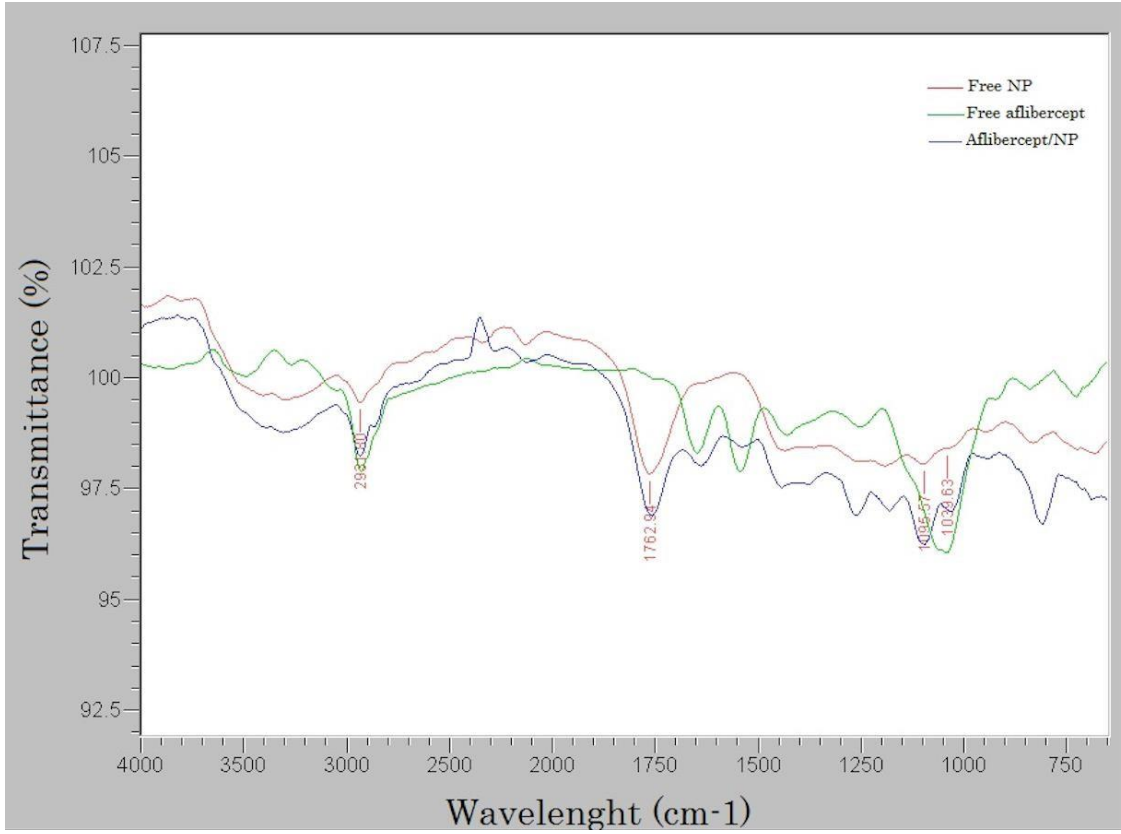
Şekil 4.5 (a) Afibercept yüklü PLGA nanopartikülleri SEM görüntüleri (20.000 büyütmede)



Şekil 4.5 (b) Liyofilizasyon sonrası aglomerasyon ve yapısal değişiklikler

4.1.3 FTIR Analizi

Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinin FTIR spektroskopik analizi incelendiğinde PLGA nanopartiküllerine ait literatür ile uyumlu, 1755 bandına uygun şekilde C=O stretching vibration, 3302 bandında OH end group, 2918 bandında C-H stretches and 1170 bandında C-O stretching vibrations yer almaktadır[181]. Aflibercept molekülüne ait bağ stretching vibration ise en güçlü 1087 bandında olmak üzere C-O tarafından oluşturulmaktadır. Bu bulgular enkapsülasyon işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.6).

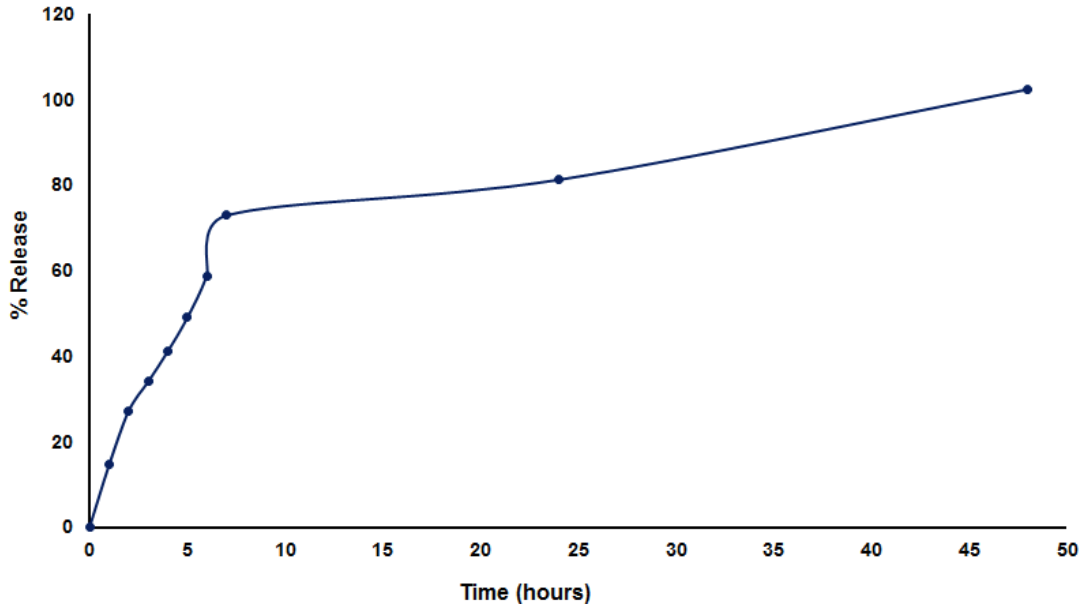


Şekil 4.6 Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerin FTIR analizi

4.2 In vitro İlaç Salım Analizleri

In vitro PLGA nanopartiküllerden Aflibercept salımı pH7.4'de fosfat tampon solüsyonu (PBS) içinde çalışıldı. Ph değerleri normal fizyolojik değerler simüle edilecek şekilde seçildi. Tipik bir salım denemesi için farklı miktarlarda nanopartikül 37 C⁰ çalkalama inkübatöründe 60 rpm ve PH 7.4' de dializ membran sarılı kapsüller içerisine 1 ml PBS içerisinde çözülerek 15 ml PBS içerisinde salıma bırakıldı. Salıma bırakıldıktan sonra her saat başı 15 ml lik depo PBS den 1ml lik örnekler alındı ve 280 nm de UV-Vis Spectroscopy ile daha önceki standart kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak ölçümler değerlendirildi. İlaç salım grafiği çıkarıldı.

Kümülatif ilaç salım profili Şekil 4.7' de görülmektedir. İlaç salım dinamiği 48 saat boyunca izlendi. Nanopartiküllere yüklenmiş olan Aflibercept salımının 72.9% nun ilk 7 saat içerisinde gerçekleştiği görüldü. Yüklenen tüm Aflibercept molekülünün (100%)'nün ise 48. saatte tamamlandığı izlendi(Şekil 4.7).

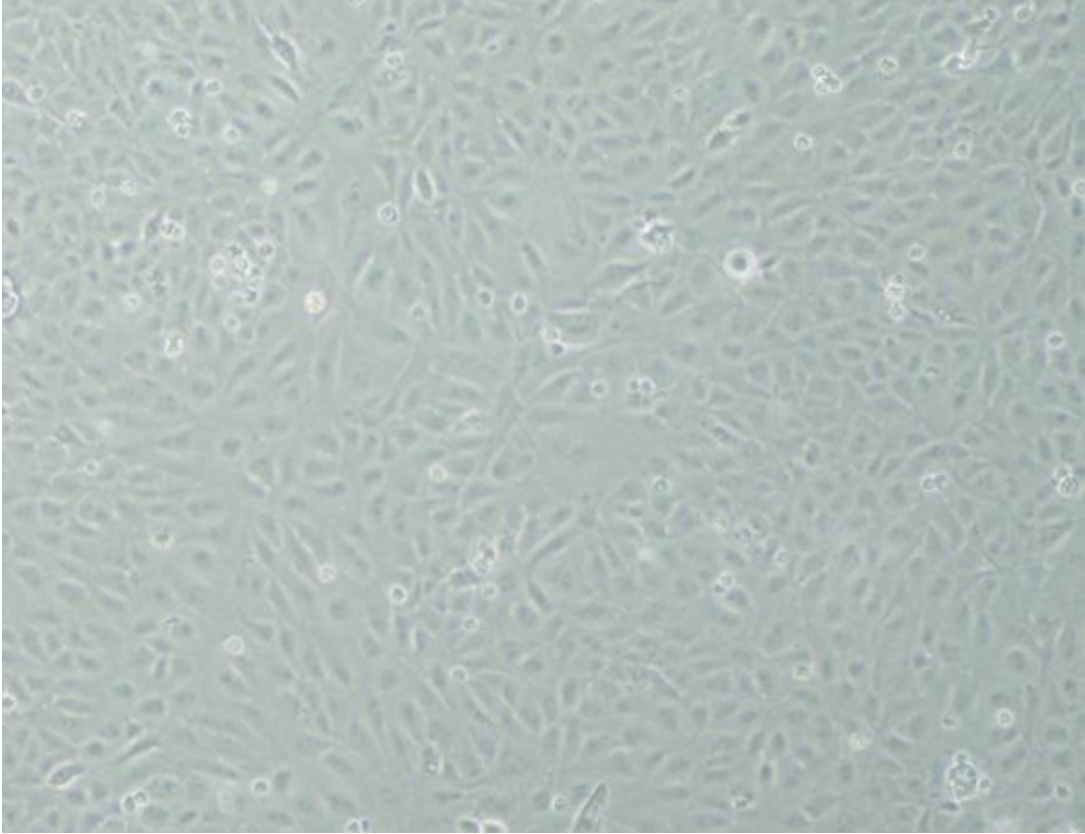


Şekil 4.7 Kümülatif ilaç salım profili

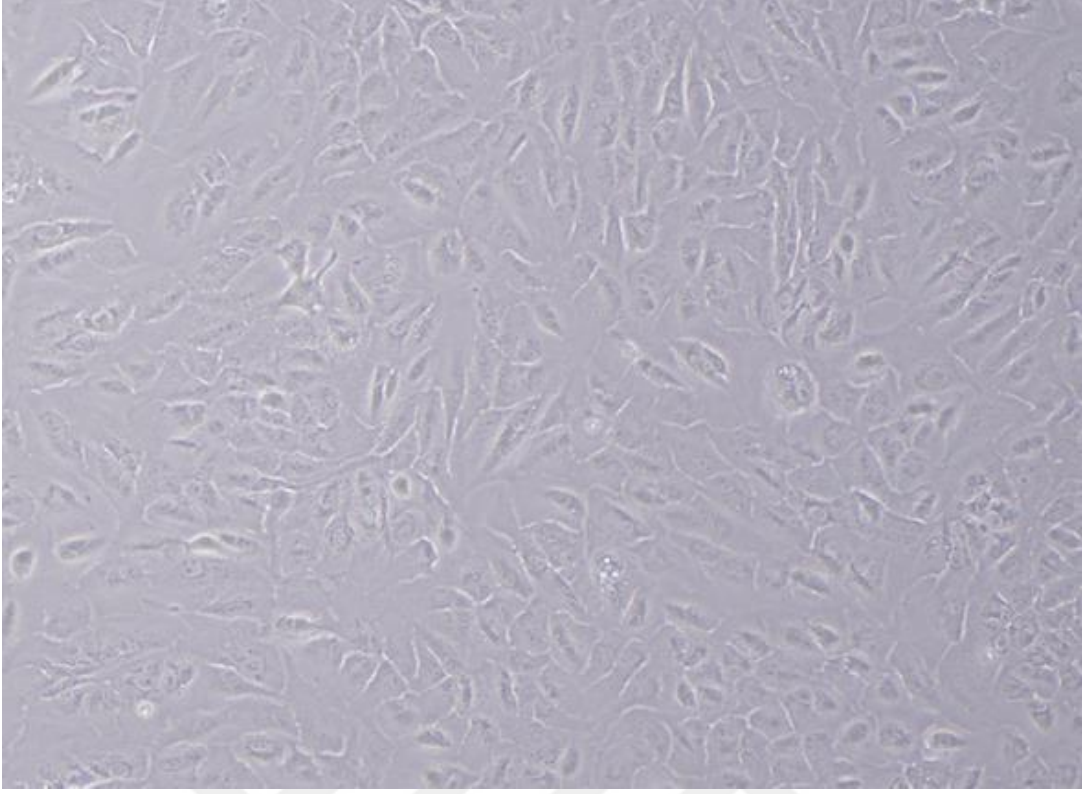
4.3 Boş PLGA ve Aflibercept Yüklü Nanopartiküllerin Her İki Hücre Hattı Üzerindeki Toksikite Profilinin Değerlendirilmesi

4.3.1 Hücre Kültürü

Human retina pigment epitelyal (ARPE- 19) hücre hattı F12 (1:1) içeren Dulbecco's modified Eagle's mediumunda 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek üretildi ve 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penisillin and 100 mg/mL streptomisin ile desteklendi. RVECs endothelial cell medium kit ile 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek kültüre edildi.



Şekil 4.8 (a) Kültürü yapılmış ARPE-19 hücre hattı izlenmekte



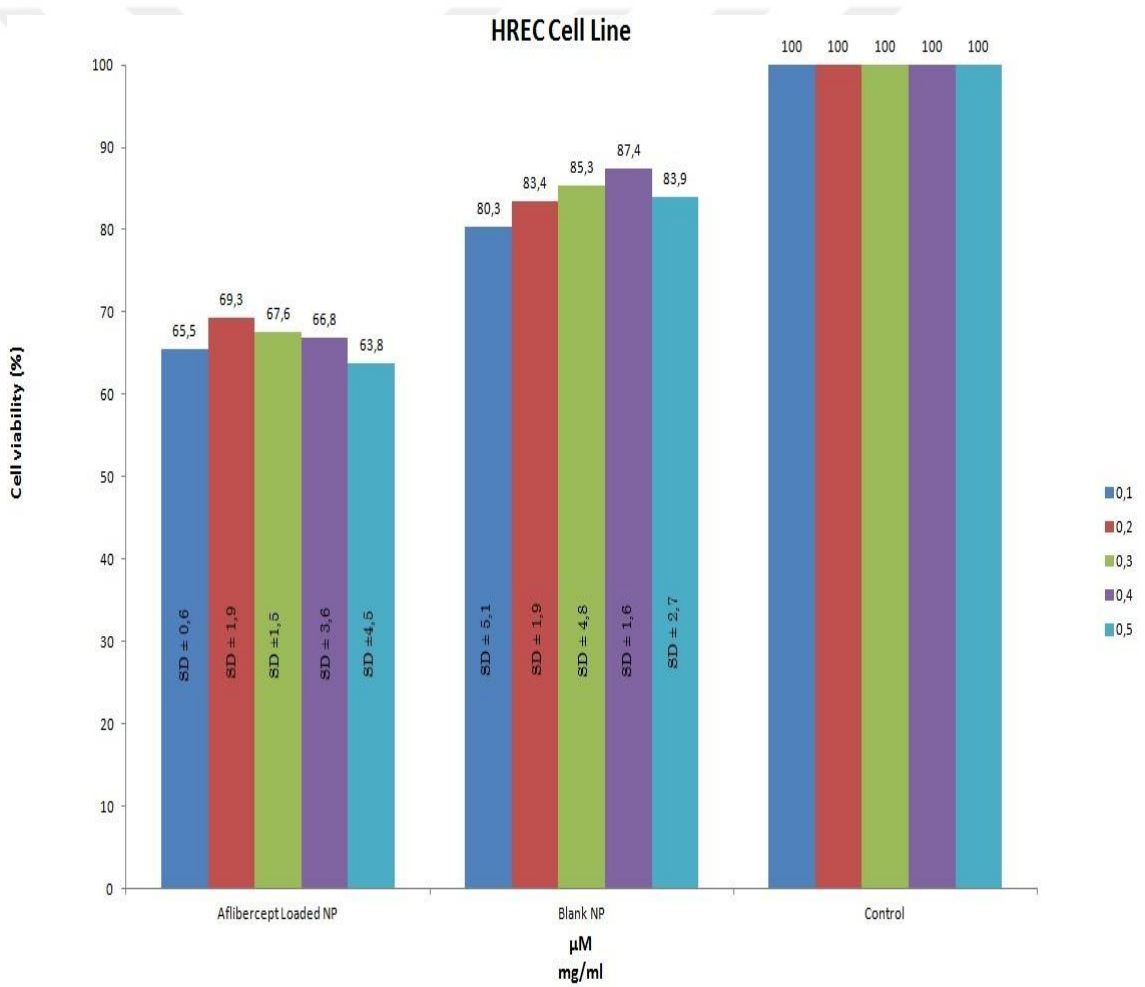
Şekil 4.8 (b) Kültürü yapılmış RVECs hücre hattı izlenmekte

4.3.2 Sitotoksosite Çalışmaları

Hücre toksisitesi değerlendirme amaçlı ARPE-19 ve RVECs(HREC) hücreleri üzerine boş PLGA ve Aflibercept yüklenmiş PLGA nanopartiküllerin etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid tuz (MTT) sitotoksosite testi ile değerlendirildi. Hücreler 96-well plate'e 5000 cells/well olacak şekilde ekildi. 24-48 saat 37°C ve %5 CO₂ ayarlı inkübatörde bekletilerek kültüre edildi. Her iki deneyde de 1. Sütun boş besi yeri ve 2. Sütün sadece hücre kültürünün yapıldığı kolon olarak seçildi. 3. sütundan itibaren 0.1 µM konsantrasyonda başlamak üzere her bir kolona PLGA nanopartikül / yüklü PLGA(Aflibercept) nanopartikülü artan dozlarda 0.5 µM'a kadar eklendi. 48 saat inkübasyon sonrası 5mg/ml olacak şekilde hazırlanmış MTT solüsyondan 10 µl her kuyuya eklendi ve 4 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Plakalar mikroskopta incelendi farmazon kristallerinin

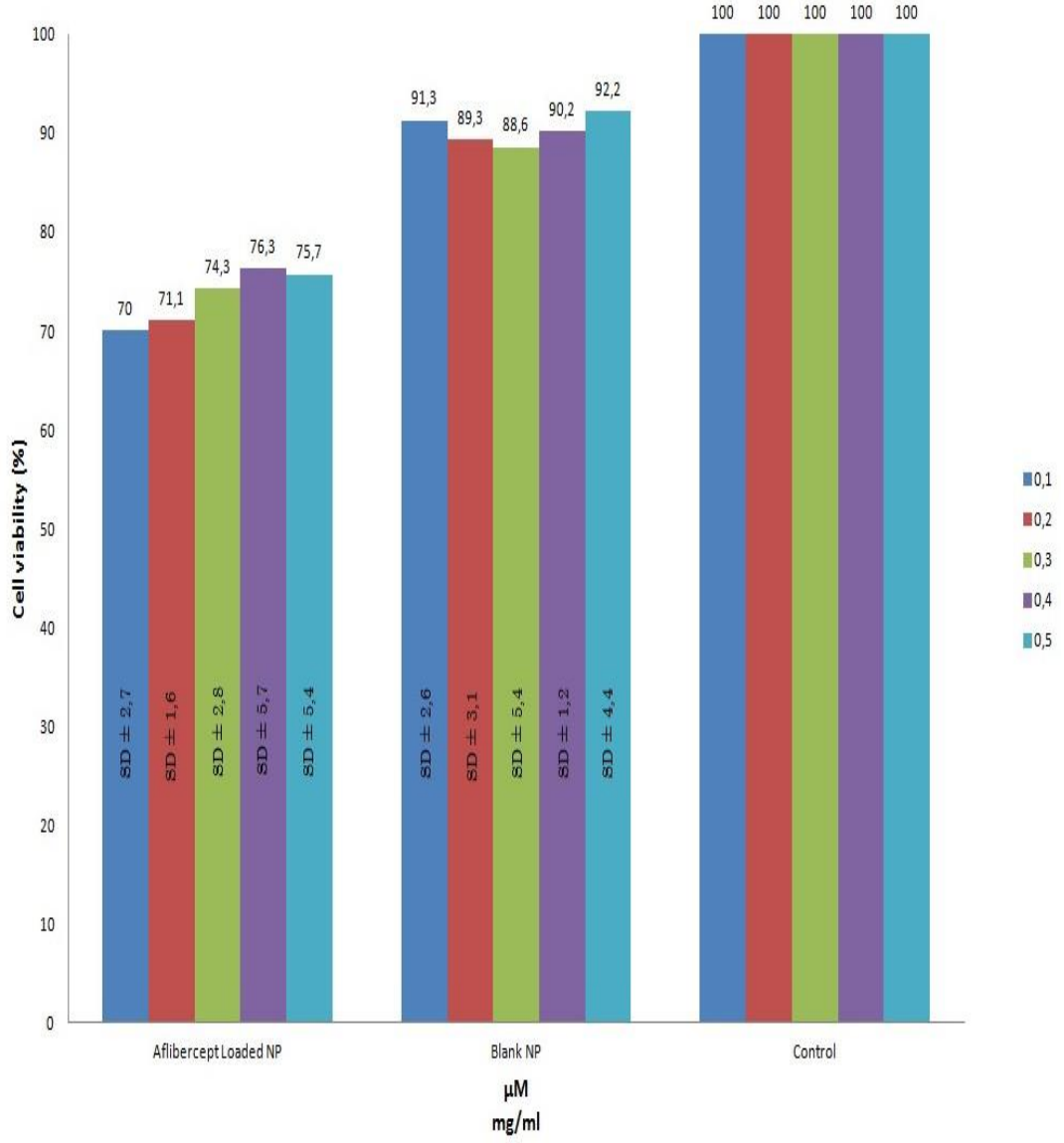
oluştugu gözlemlendi. Ardından kristallerin çözünmesi için her kuyuya 100 µl DMSO eklendi ve 30 dk karanlıkta bekletilip eliza okuyucuda 560 nm ölçümler alındı. Aynı işlem 72. Saat toksisite sonuçlarını değerlendirmek üzere de tekrarlandı (Şekil 4.11).

Analiz sonuçlarında her iki hücre hattı üzerinde de Aflibercept yüklü ve boş PLGA nanopartiküllerinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 0.5 µM doza kadar toksik olduğu izlendi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Her iki hücre hattı üzerinde de Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerin boş PLGA nanopartiküllerine göre 0.5 µM ve altındaki dozlarda istatistiksel anlamlı toksisite gösterdiği izlendi ($p < 0.05$).

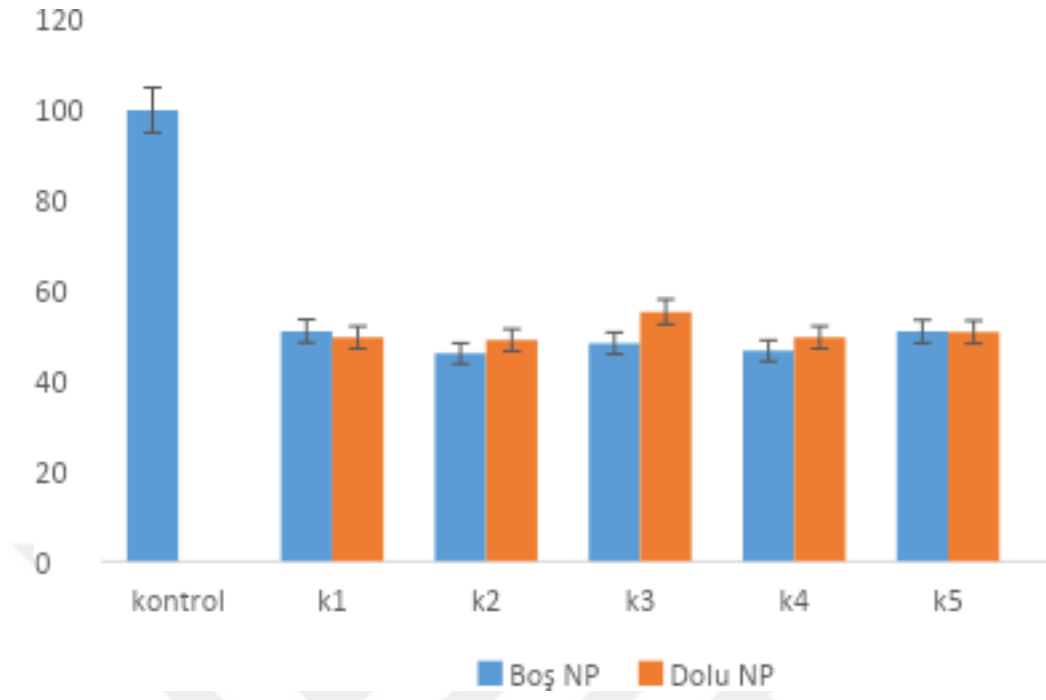


Şekil 4.9 48 saatlik inkübasyon sonrası RVECs/HRECs hücre hattı üzerine Aflibercept yüklü-PLGA ve boş-PLGA nanopartiküllerin etkisi

ARPE-19 Cell Line



Şekil 4.10 48 saatlik inkübasyon sonrası ARPE-19 hücre hattı üzerine Afibercept yüklü-PLGA ve boş-PLGA nanopartiküllerin etkisi



Şekil 4.11 Boş ve dolu (Aflibercept yüklü PLGA) nanopartiküllerin 72. Saatte RVECs/HRECs hücreleri hattı üzerine etkisi

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler nanotaşıyıcı sistemlere dayalı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesine ve tedavide daha etkin sonuçlar elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Nanoteknolojik gelişmelerin kullanıldığı alanlardan bir tanesi de oftalmolojidir ve oküler neovasküler hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılan ilaçların etkinlik sürelerinin uzatılması çalışılan alanların başında gelmektedir. Bu çalışma ile birlikte Aflibercept yüklü düzgün yüzeyli yuvarlak PLGA nanopartiküller sentezlendi (Şekil 4.5 (a)), yeni bir ilaç salınım sistemi geliştirmek amaçlı Aflibercept salım süresi 48 saat kadar uzatıldı.

Günümüzde senil makula dejeneresansı, diyabetik retinopati, retinal ven tıkanıklığı ve retinanın diğer iskemik göz hastalıklarına sahip hastalar için anti-VEGF ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Topikal uygulamada bu ilaçların sadece %5' inin posterior segmente ulaştığı göz önüne alınarak uygulama yöntemleri direkt intravitreal uygulama şeklinde olmaktadır. İntravitreal anti-VEGF enjeksiyon uygulamasının lokal ve sistemik komplikasyonlarının önüne geçmenin yahut azaltmanın tek yolu uygulanan enjeksiyon sayısının azaltma veya iki enjeksiyon arasındaki sürenin uzatılmasıdır.

Güncel intravitreal uygulama dozları ve aralığı anti-VEGF ajanların vitreus içindeki yarılanma ömrü $t_{1/2}$ tarafından belirlenmektedir. Literatüre baktığımızda anti-VEGF ajanların vitreus içindeki ve göz içindeki farmakodinamiği ile ilgili yapılmış çalışmalar sınırlı olmakla beraber Bevacizumabın yarı ömrü 9.8 gün, Ranibizumabın ise 7.2 gündür [38][183]. Aynı zamanda insan gözündeki yarı ömürleri ile ilgili ise yapılmış vitreus verileri olmamakla beraber indirekt aköz ölçümleri veya serum değerleri üzerinden ya da matematiksel modellerle yapılan değerlendirmelerle elde edilmiş veriler bulunmaktadır [29][34][184-187]. Bu moleküllerden en son jenerasyon olarak halihazırda FDA onayı almış ve oküler neovaskülarizasyon tedavisi amacıyla kullanılan Aflibercept molekülünün insan

gözündeki yarılanma zamanı ise tam olarak bilinmemekle beraber hayvan çalışmalarında 2.44 gün olduğu tespit edilmiştir [188]. Bu yarılanma sürelerinden yola çıkarak Bevacizumab ve Ranibizumab 3 aylık yükleme dozu sonrası aylık, Aflibercept ise 3 aylık yükleme dozu sonrası 2 ayda bir enjeksiyon şeklinde tedavi protokolü günümüzde uygulanmaktadır [36][135][138][189]. Enjeksiyon sayısının belirsizliği, lokal ve sistemik komplikasyonların varlığı, hasta uyumu ve toplam maliyet göz önüne alındığında bu enjeksiyon protokolleri benzer etkinlik sağlayacak şekilde modifiye edilme yoluna gidilmesine sebep olmuştur. Bu amaçla hali hazırda yapılan enjeksiyon sayısını azaltmak amaçlı kullanılan protokol ise treat and extend protokolü olup enjeksiyon aralıklarını açarak toplam enjeksiyon sayısını azaltmayı hedefleyen bir protokol olarak karşımıza çıkmaktadır [190-192]. Bu amaçla ilaç yarı ömürlerini uzatmak için kullanılır hale gelmiş diğer bir seçenek ise nanotıp uygulamalarıdır. Literatürde Ranibizumab ve Bevacizumabın vitreus yarı ömrünü uzatmak amaçlı geliştirilmiş ilaç taşıyım sistemleri bulunmakla birlikte Aflibercept üzerine yapılmış ilaç taşıyım sistemleri yok denecek kadar azdır [96][193-197]. Bu çalışmalar hala prelinik çalışma niteliğinde olup rutin klinik kullanıma girmeleri söz konusu olamamıştır. Aflibercept temelli geliştirilen tek polimerik nanopartikül yapısındaki ilaç taşıyım sistemi ise Kelly ve ark. tarafından geliştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre PLGA nanopartikülü sentez sürecindeki enkapsülasyon etkinliği $75.76 \pm 2.59\%$ ve 1 mg Aflibercept ile uygulanan deney prosesinde ise ilaç yükleme kapasitesi $7.76 \pm 0.24\%$ 'dır. Ancak mevcut çalışmada FTIR analizine yönelik herhangi bir veri bulunmamaktadır. Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinin ilaç salım profili ise ilk 2 saatte burst salım ve 7. günde ise yüklenen tüm ilaç miktarının salınması yönündedir [196]. Bizim çalışmamızda ise 2 mg Aflibercept ile gerçekleştirilen sentez sonucunda enkapsülasyon etkinliği $85.2 \pm 1.08\%$ olarak, ilaç yükleme kapasitesi ise $10.4 \pm 4.5\%$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Aynı zamanda FTIR analizi ile ilaç yüklenmesi doğrulanmıştır. Sistem olarak burst salım ilk 7 saatte gerçekleştirilen ilaç salımı 48 saate kadar uzamıştır. Mevcut sonuçlar ile geliştirilmiş olan ilaç taşıyıcı sistemin ideal salım süresine ne kadar yakın olduğu konusunda karşılaştırma yapma, anti-VEGF lerin göz içi farmakodinamiğinin net olarak bilinmemesi nedeniyle kesin bir şekilde yapılamamaktadır. Çünkü Aflibercept molekülünün

insan vitreusundaki yarı ömrü hala net olarak bilinmemektedir. Bu durum ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için ciddi bir sorun teşkil etmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerdeki diğer önemli bir özellik ise sentezlenen nanopartikül boyutu ve yüzey yüküdür. Sentezlenen nanopartikül boyutu yüklenen ilacın salım dinamiğini belirlerken yüzey yükü ise vitreus içindeki farmakodinamiği belirlemektedir. Xu ve ark. yapmış olduğu çalışmada yüzey yükü (surface potential) pozitif olan nanopartiküllerin vitreus içindeki hyaluronik asit ve diğer proteinlere tutunarak göz içerisinde daha uzun süre kaldığını göstermiştir[198]. Aynı zamanda pozitif yüzey yüküne sahip moleküllerin hücre penetrasyonunun daha iyi olduğu gösterilmiştir [3][32][199]. Partikül boyutunun ise vitreus içi yarılanma zamanı ile ilişkisine yönelik kesin sonuçları gösteren çalışmalar hala bulunmamaktadır [200,201]. Bu bilgiler ışığında Kelly ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada partikül boyutu 243.13 ± 17.64 nm olup yüzey yükü hakkında herhangi bir bildirimde bulunulmamıştır. Mevcut çalışmamızda ise sentezlenen Aflibercept yüklü nanopartikülün boyutu 262.66 ± 6.62 ve yüzey yükünün $+6.27 \pm 4.97$ yönde olduğu görülmüştür. Bu sonuç partikülün vitreus içerisinde daha uzun süre kalacağı yönünde umut vaatmektedir.

Yüzey yükü dışında ilaç taşınım sistemi amacıyla kullanılacak nanopartiküllerin aynı zamanda yüzey düzgünlüğü ve partikül şekli de hücreler üzerindeki etkisini belirlemektedir. Hücreler ile temasa geçecek ideal yüzey şekli yuvarlak, düzgün ve aynı özellik göstermelidir [202]. Sentezlenen nanopartiküllerin PDI değerlerinin 0-0.1 arasında olması boyut olarak uniformiteyi gösteren bir değerdir [203]. Kelly ve ark. yapmış olduğu çalışmada bu değer 0.201 ± 0.071 olup mevcut çalışmamızda ise 0.12 ± 0.016 'dir ve uniform bir özellik göstermektedir. Fakat nanopartikül çalışmalarında sentez sonrası bu uniform yapının ve partikül boyutu liyofilizasyon işlemine bağlı bozulması ve agglomerat olması mümkün olabilmektedir. Var olan yapının stabilitesinin sağlanması başlı başına nanopartikül sentez ve saklanma prosesine ait bir sorundur(Şekil 4.5 (b)).

İlaç yarı ömrünü uzatma ve etkinlik çalışmaları yapılırken en önemli hedeflenen sonuçlardan bir tanesi de sentezlenen ilaç taşıyıcı sistemlerin tedavi planlanan doku için toksisite bulguları içerip içermemesidir. Mevcut çalışmamızda kullanılan

PLGA polimeri olup FDA tarafından okuler kullanım için onay almış biyouyumlu ve biyodegradable bir moleküldür. Fakat daha önce Lin et al. yapmış olduğu çalışmada ARPE-19 ve mikrovasküler retinal endotelyal hücreler için toksik olduğu yönünde sonuçlara ulaşılmıştır [204]. Aynı zamanda toksisite nedenlerinden biri olarak da Chu ve ark. yapmış olduğu çalışmada boyut, yüzey yükü ve kimyasal özelliklerden bağımsız olarak nanopartikül şeklinin toksiste çalışmalarında önemli olduğu gösterilmiştir [202]. Nanopartikül boyutu ile yapılmış bir çalışmada 200 nm altındaki naopartiküllerin retinayı rahatlıkla penetre ettiği ve birikinti olduğu görülmüştür. Fakat bu birikintilerin uzun vadede retinaya etkileri yönünde sonuçlar bulunmamaktadır [205]. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda ARPE-19 hücre line üzerinde her üç anti-VEGF molekülünün de toksik olmadığı gösterilmiştir [206,207]. RVECs hücreleri üzerine ise yapılmış toksisite testi bulunmamaktadır. Aflibercept molekülü ise okuler kullanımda onay almış bir molekül olup Parisi et al. yapmış olduğu çalışmada insan retina pigment epitel hücreleri üzerine proliferasyon baskılayıcı bir özelliği olmadığı gösterilirken RVECs hücre line üzerine etkileri yönünde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır[208]. Ayrıca toksisite çalışmaları için gerekli ARPE-19 ve RVECs hücreleri üzerine yapılmış Aflibercept inhibitor konsantrasyon (IC50) toksisite testleri literatürde bulunmamakla beraber Yu et al . bovine retinal mikrovasküler endotelyal hücrelerde yapmış oldukları çalışmada inhibitor konsantrasyon 0.668 nM (nanomolar) olarak bulunmuştur [209]. Kelly ve ark yapmış olduğu çalışmada ise 0.5 ve 1 µM konsantrasyonlarda boş ve Aflibercept yüklü nanopartiküllerin ARPE-19 hücreler üzerindeki toksik etkilerini değerlendirmiştir. Sonuç olarak ise her iki konsantrasyonda da her iki formdaki naopartiküllerin toksik olduğu görülmüştür [196]. Mevcut çalışmamızda ise bu sonuçlar göz önünde bulundurularak 0.5 µM altı olmak üzere 0.1 ile 0.5 µM arasında değişik konsantrasyonlarda ARPE-19 ve RVECs(HREC) hücreleri üzerinde yapılan toksisite çalışmalarında istatistiksel anlamlı toksisite izlenmektedir(Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

Nanopartikül çalışmalarının en büyük sorunlarından bir tanesi de sentezlenen nanopartikülde liyofilizasyon işlemi sonrası gerçekleşen agregasyonlar ve partikül boyuttundaki büyümedir. Aynı zamanda nanopartikül sentezi sırasında sonikasyon

ve liyofilizasyon işlemine bağlı enkapsülasyon yapılan antikorların moleküler satbilizasyonlarının devam edebilirliğidir. Mevcut çalışmamızda sentez sonarsına ait boyut, PDI, yüzey yükü ve Aflibercept etkinliğini gösteren sonuçlar bulunmamakla beraber klinik kullanım etkinlik çalışmaları için bu çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Mevcut ilaç salım sonuçları değerlendirildiğinde, ilaç salım profilinde Afliberceptin % 79,2'sinin ilk 7 saatte hızla, 100 %ünün ise 48. saatin sonunda PLGA nanopartiküllerinin dışında bırakıldığı görüldü. Bu salım profili ile in vitro deneysel sonuçları kontrol ettiğimizde, 48 saatte yapılan MTT analiz sonuçlarının, kontrollü bir ilaç taşıyıcı sistemi olarak tasarlanan Aflibercept yüklü PLGA nanopartiküllerinin hem ARPE-19 hem de RVECs hücre hatları üzerinde toksik olduğu sonucuna varıldı. Sentez aşamasında optimum boyutlarda (262 ± 6.6 nm) Aflibercept yüklü PLGA nanopartikülleri elde edilmesine rağmen, bu nanopartiküllere yüklenen ilaç moleküllerinin çok hızlı bir şekilde ilk 7 saat içinde ortama serbestleştiği ve 48 saat içinde tamamen salıma uğradıkları görülmüştür. 48 saatlik in vitro salım dianamiği, in vivo Aflibercept uygulaması için yeterli kanıt elde etmiyor olabilmekle beraber daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmaları diğer FDA onaylı veya biyouyumlu polimerlerle test etmek daha uygun görünmektedir.

Tez kapsamında elde sonuçları ve önerileri aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

- Sonuç olarak nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça zor, klinik kullanıma sokulması için ciddi zaman ihtiyacı bulunmaktadır ve bir çok faktörün optimize edilmesi gerekmektedir.
- Halihazırda sentezlenmiş nanopartikül ile invirto şartlarda Aflibercept salım süresi 48 saat olup daha uzun süre salım gösteren nanopartiküllerin sentezlenebilmesi için molekül ağırlığı daha büyük PLGA nanopartikülleri ya da FDA onaylı diğer polimerik nanopartiküller ile deneysel çalışmalar tekrarlanmalıdır.

- Sentezlenen nanopartiküllerin şekil, yüzey yükü, boyut açısından uniform olması gerekliliğinin yanısıra sentez sırası ve sonrasında etken/ilâç maddenin stabilitesinin sağlanması da gerekmektedir.
- Aynı zamanda uzun dönem nanopartikül sentezi için kullanılan polimerik materyalin retinal toksisitesinin olmadığından emin olunması gerekmektedir.
- Anti-VEGF uygulanmasının gerçeğe yakın bir şekilde ilâç taşıyıcı sistem haline getirilebilmesi ve mevcut çalışmalar ile karşılaştırmalı sonuçların verilebilmesi için anti-VEGF ilâçların insan gözündeki farmokodinamilerinin ve yarılanma zamanlarının bilinmesi gerekmektedir.
- Mevcut çalışma ile literatür bilgisi ile uyumlu boyut, yüzey yükü ve üniformitede ve belirlenen konsantrasyonda ARPE-19 ve RVECs hücre hatları üzerine toksik etki gösteren Aflibercept yüklü PLGA nanopartikülleri sentezlenmiş olup, mevcut molekülün klinik kullanıma girmeden önce Aflibercept molekülüne ve nanopartikül fizikokimyasal özelliklerine ait stabilite çalışmaları ve vitreus farmakokinetiğini gösteren çalışmaların yapılması gerekmektedir.

- [1] N. Ferrara, L. Damico, N. Shams, H. Lowman, and R. Kim, "Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration," *Retina*. 2006, doi: 10.1097/01.iae.0000242842.14624.e7.
- [2] M. W. Stewart and F. J. Rosenfeld, "Predicted biological activity of intravitreal VEGF Trap," *Br. J. Ophthalmol.*, 2008, doi: 10.1136/bjo.2007.134874.
- [3] J. Holash *et al.*, "VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, doi: 10.1073/pnas.172398299.
- [4] J. S. Rudge *et al.*, "VEGF Trap complex formation measures production rates of VEGF, providing a biomarker for predicting efficacious angiogenic blockade," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, doi: 10.1073/pnas.0708865104.
- [5] S. Sarwar *et al.*, "Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration," *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016, doi: 10.1002/14651858.CD011346.pub2.
- [6] J. G. Wong and K. Y. Qian, "Long-Term Follow-Up of Polypoidal Choroidal Vasculopathy Secondary to Angioid Streaks Treated by Intravitreal Aflibercept and Ranibizumab," *Case Rep. Ophthalmol.*, 2017, doi: 10.1159/000468144.
- [7] Arakawa, M. Inoue, S. Sato, S. Yamane, and K. Kadonosono, "Efficacy of intravitreal aflibercept injections for japanese patients with polypoidal choroidal vasculopathy," *Clin. Ophthalmol.*, 2017, doi: 10.2147/OPHTH.S129164.
- [8] R. Korol, O. S. Zadorozhnyy, V. O. Naumenko, T. B. Kustryn, and N. V. Pasychnikova, "Intravitreal aflibercept for the treatment of choroidal neovascularization associated with pathologic myopia: A pilot study," *Clin. Ophthalmol.*, 2016, doi: 10.2147/OPHTH.S117791.
- [9] Y. Sakanishi, A. Usui-Ouchi, K. Tamaki, K. Mashimo, R. Ito, and N. Ebihara, "Short-term outcomes in patients with branch retinal vein occlusion who received intravitreal aflibercept with or without intravitreal ranibizumab," *Clin. Ophthalmol.*, 2017, doi: 10.2147/OPHTH.S133594.
- [10] G. A. Moustafa and M. M. Moschos, "Intravitreal aflibercept (Eylea) injection for cystoid macular edema secondary to retinitis pigmentosa - A first case report and short review of the literature," *BMC Ophthalmol.*, 2015, doi: 10.1186/s12886-015-0033-z.
- [11] Z. Oztas, S. Nalcaci, and C. Akkin, "Intravitreal aflibercept for ruptured retinal arterial macroaneurysm," *International Journal of Ophthalmology*. 2017, doi: 10.18240/ijo.2017.03.27.
- [12] J. G. Ghosh *et al.*, "Long-acting protein drugs for the treatment of ocular diseases," *Nat. Commun.*, 2017, doi: 10.1038/ncomms14837.

- [13] Richard T. Addo, *Ocular Drug Delivery: Advances, Challenges and Applications* 1st ed. Springer International Publishing, 2016.
- [14] Seeley RR, Stephens TD, Tate P, *Anatomy and Physiology. 8 ed.* New York, NY: McGraw Hill, 2008.
- [15] M. S. Lawrence and J. W. Miller, "Ocular tissue permeabilities," *International Ophthalmology Clinics*. 2004, doi: 10.1097/00004397-200404430-00008.
- [16] M. Rawas-Qalaji and C. A. Williams, "Advances in ocular drug delivery," *Current Eye Research*. 2012, doi: 10.3109/02713683.2011.652286.
- [17] D. Evin, A. Hadad, A. Solano, and B. Drozdowicz, "Segmentation Fusion Techniques with Application to Plenoptic Images: A Survey,," 2016, doi: 10.1088/1742-6596/705/1/012026.
- [18] U. B. Kompella, A. C. Amrite, R. Pacha Ravi, and S. A. Durazo, "Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging," *Progress in Retinal and Eye Research*. 2013, doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.04.001.
- [19] J. B. Jonas, U. H. Spandau, and F. Schlichtenbrede, "Short-term complications of intravitreal injections of triamcinolone and bevacizumab," *Eye*, 2008, doi: 10.1038/eye.2008.10.
- [20] S. R. Patel, A. S. P. Lin, H. F. Edelhauser, and M. R. Prausnitz, "Suprachoroidal drug delivery to the back of the eye using hollow microneedles," *Pharm. Res.*, 2011, doi: 10.1007/s11095-010-0271-y.
- [21] P. A. Campochiaro, "Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases," *Progress in Retinal and Eye Research*. 2015, doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.002.
- [22] D. R. Senger and G. E. Davis, "Angiogenesis," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a005090.
- [23] K. V. Chalam, V. S. Brar, and R. K. Murthy, "Human ciliary epithelium as a source of synthesis and secretion of vascular endothelial growth factor in neovascular glaucoma," *JAMA Ophthalmol.*, 2014, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2014.2356.
- [24] C. Kaur, "Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage," *Clin. Ophthalmol.*, 2008, doi: 10.2147/opth.s3361.
- [25] M. Kim, C. Lee, R. Payne, B. Y. J. T. Yue, J. H. Chang, and H. Ying, "Angiogenesis in glaucoma filtration surgery and neovascular glaucoma: A review," *Survey of Ophthalmology*. 2015, doi: 10.1016/j.survophthal.2015.04.003
- [26] Bevacizumab prescribing information. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125085s0168lbl.pdf (Accessed November 28, 2020).
- [27] FDA. US Food and Drug Administration. FDA Approves New Biologic Treatment for West Age-Related Macular Degeneration. <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/2006/ucm108685.htm> (Accessed November 28, 2020)

- [28] E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, and A. P. Adamis, "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease," *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006, doi: 10.1038/nrd1955.
- [29] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors," *FASEB J.*, 1999, doi: 10.1096/fasebj.13.1.9.
- [30] E. Tischer *et al.*, "The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing," *J. Biol. Chem.*, 1991.
- [31] N. Ferrara, H. P. Gerber, and J. LeCouter, "The biology of VEGF and its receptors," *Nature Medicine*. 2003, doi: 10.1038/nm0603-669.
- [32] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress," *Endocrine Reviews*. 2004, doi: 10.1210/er.2003-0027.
- [33] S. J. Bakri, M. R. Snyder, J. M. Reid, J. S. Pulido, M. K. Ezzat, and R. J. Singh, "Pharmacokinetics of Intravitreal Ranibizumab (Lucentis)," *Ophthalmology*, 2007, doi: 10.1016/j.ophtha.2007.09.012.
- [34] M. W. Stewart, "What are the half-lives of ranibizumab and aflibercept (VEGF Trap-eye) in human eyes? Calculations with a mathematical model," *Eye Reports*, 2011, doi: 10.4081/eye.2011.e5.
- [35] C. H. Meyer and F. G. Holz, "Preclinical aspects of anti-VEGF agents for the treatment of wet AMD: Ranibizumab and bevacizumab," *Eye*. 2011, doi: 10.1038/eye.2011.66.
- [36] N. Papadopoulos *et al.*, "Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab," *Angiogenesis*, 2012, doi: 10.1007/s10456-011-9249-6.
- [37] S. J. Bakri, M. R. Snyder, J. M. Reid, J. S. Pulido, and R. J. Singh, "Pharmacokinetics of Intravitreal Bevacizumab (Avastin)," *Ophthalmology*, 2007, doi: 10.1016/j.ophtha.2007.01.017.
- [38] T. U. Krohne, N. Eter, F. G. Holz, and C. H. Meyer, "Intraocular Pharmacokinetics of Bevacizumab After a Single Intravitreal Injection in Humans," *Am. J. Ophthalmol.*, 2008, doi: 10.1016/j.ajo.2008.05.036.
- [39] L. García-Quintanilla *et al.*, "Pharmacokinetics of intravitreal anti-VEGF drugs in age-related macular degeneration," *Pharmaceutics*. 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11080365.
- [40] C. Balaratnasingam, E. Dhrami-Gavazi, J. T. McCann, Q. Ghadiali, and K. Bailey Freund, "Aflibercept: A review of its use in the treatment of choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration," *Clinical Ophthalmology*. 2015, doi: 10.2147/OPHTH.S80040.
- [41] Q. D. Nguyen *et al.*, "Placental growth factor and its potential role in diabetic retinopathy and other ocular neovascular diseases," *Acta Ophthalmologica*. 2018, doi: 10.1111/aos.13325.

- [42] Moradi *et al.*, "Placental growth factor and its potential role in diabetic retinopathy and other ocular neovascular diseases, " *World J Diabetes*. 2013;4:303–309.
- [43] S. J. Park *et al.*, "Intraocular pharmacokinetics of intravitreal aflibercept (Eylea) in a rabbit model," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016, doi: 10.1167/iovs.16-19204.
- [44] Prevent Blindness America website. Available: <http://www.visionproblemsus.org/diabetic-retinopathy/diabetic-retinopathy-map.html> (Accessed November 28,2020)
- [45] J. H. Kempen *et al.*, "The Prevalence of Diabetic Retinopathy among Adults in the United States," *Arch. Ophthalmol.*, 2004, doi: 10.1001/archoph.122.4.552.
- [46] T. S. Kern, J. Tang, and B. A. Berkowitz, "Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice," *Mol. Vis.*, 2010.
- [47] T. S. Kern and A. J. Barber, "Retinal ganglion cells in diabetes," 2008, doi: 10.1113/jphysiol.2008.156695.
- [48] J. Barber, T. W. Gardner, and S. F. Abcouwer, "The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2011, doi: 10.1167/iovs.10-6293.
- [49] G. Tremolada *et al.*, "The role of angiogenesis in the development of proliferative diabetic retinopathy: Impact of intravitreal anti-VEGF treatment," *Experimental Diabetes Research*. 2012, doi: 10.1155/2012/728325.
- [50] Q. Mohamed, M. C. Gillies, and T. Y. Wong, "Management of diabetic retinopathy: A systematic review," *Journal of the American Medical Association*. 2007, doi: 10.1001/jama.298.8.902.
- [51] N. Cheung, P. Mitchell, and T. Y. Wong, "Diabetic retinopathy," 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3.
- [52] R. F. Gariano and T. W. Gardner, "Retinal angiogenesis in development and disease," *Nature*. 2005, doi: 10.1038/nature04482.
- [53] T. A. Mendel *et al.*, "Pericytes Derived from Adipose-Derived Stem Cells Protect against Retinal Vasculopathy," *PLoS One*, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065691.
- [54] Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, "Endothelial/pericyte interactions," *Circulation Research*. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7.
- [55] J. W. Shay and W. E. Wright, "Hayflick, his limit, and cellular ageing," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000, doi: 10.1038/35036093.
- [56] A. Patel *et al.*, "Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes," *N. Engl. J. Med.*, 2008, doi: 10.1056/nejmoa0802987.
- [57] H. C. Gerstein *et al.*, "Effects of Intensive Glucose Lowering in Type 2 Diabetes," *N. Engl. J. Med.*, 2008, doi: 10.1056/nejmoa0802743.

- [58] R. Klein, M. D. Knudtson, K. E. Lee, R. Gangnon, and B. E. K. Klein, "The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXII. The Twenty-Five-Year Progression of Retinopathy in Persons with Type 1 Diabetes," *Ophthalmology*, 2008, doi: 10.1016/j.ophtha.2008.08.023.
- [59] E. Carrasco, C. Hernández, A. Miralles, P. Huguet, J. Farrés, and R. Simó, "Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration," *Diabetes Care*, 2007, doi: 10.2337/dc07-0332.
- [60] T. J. Lyons *et al.*, "Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2004, doi: 10.1167/iovs.02-0648.
- [61] L. P. Aiello, "Angiogenic Pathways in Diabetic Retinopathy," *N. Engl. J. Med.*, 2005, doi: 10.1056/nejme058142.
- [62] "Focal Photocoagulation Treatment of Diabetic Macular Edema: Relationship of Treatment Effect to Fluorescein Angiographic and Other Retinal Characteristics at Baseline: ETDRS Report No. 19," *Arch. Ophthalmol.*, 1995, doi: 10.1001/archophth.1995.01100090070025.
- [63] "Photocoagulation Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy: Clinical Application of Diabetic Retinopathy Study (DRS) Findings, DRS Report Number 8," *Ophthalmology*, 1981, doi: 10.1016/S0161-6420(81)34978-1.
- [64] S. D. Solomon and M. F. Goldberg, "ETDRS Grading of Diabetic Retinopathy: Still the Gold Standard?," *Ophthalmic Research*. 2019, doi: 10.1159/000501372.
- [65] J. A. Wells *et al.*, "Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial," *Ophthalmology*, 2016, doi: 10.1016/j.ophtha.2016.02.022.
- [66] M. Amadio, S. Govoni, and A. Pascale, "Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development," *Pharmacological Research*. 2016, doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.027.
- [67] J. O. Mason, P. A. Nixon, and M. F. White, "Intravitreal Injection of Bevacizumab (Avastin) as Adjunctive Treatment of Proliferative Diabetic Retinopathy," *Am. J. Ophthalmol.*, 2006, doi: 10.1016/j.ajo.2006.04.058.
- [68] R. N. Khurana, D. V. Do, and Q. D. Nguyen, "Anti-VEGF therapeutic approaches for diabetic macular edema," *International Ophthalmology Clinics*. 2009, doi: 10.1097/IIO.0b013e31819fd8b5.
- [69] W. Abdallah and A. A. Fawzi, "Anti-VEGF therapy in proliferative diabetic retinopathy," *International Ophthalmology Clinics*. 2009, doi: 10.1097/IIO.0b013e31819fd84a.

- [70] D. S. C. Lam *et al.*, "Efficacy of 1.25 mg versus 2.5 mg intravitreal bevacizumab for diabetic macular edema: Six-month results of a randomized controlled trial," *Retina*, 2009, doi: 10.1097/IAE.0b013e31819a2d61.
- [71] M. S. Ip, A. Domalpally, J. J. Hopkins, P. Wong, and J. S. Ehrlich, "Long-term effects of ranibizumab on diabetic retinopathy severity and progression," *Arch. Ophthalmol.*, 2012, doi: 10.1001/archophthalmol.2012.1043.
- [72] Moradi, "Vascular endothelial growth factor trap-eye (Aflibercept) for the management of diabetic macular edema," *World J. Diabetes*, 2013, doi: 10.4239/wjd.v4.i6.303.
- [73] D. V. Do *et al.*, "One-year outcomes of the da VINCI study of VEGF trap-eye in eyes with diabetic macular edema," 2012, doi: 10.1016/j.opthta.2012.02.010.
- [74] D. V. Do *et al.*, "The da VINCI study: Phase 2 primary results of VEGF trap-eye in patients with diabetic macular edema," *Ophthalmology*, 2011, doi: 10.1016/j.opthta.2011.02.018.
- [75] H. Funatsu, H. Noma, T. Mimura, S. Eguchi, and S. Hori, "Association of Vitreous Inflammatory Factors with Diabetic Macular Edema," *Ophthalmology*, 2009, doi: 10.1016/j.opthta.2008.09.037.
- [76] H. Tamura *et al.*, "Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005, doi: 10.1167/iovs.04-0905.
- [77] M. Nauck, G. Karakiulakis, A. P. Perruchoud, E. Papakonstantinou, and M. Roth, "Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells," *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, doi: 10.1016/S0014-2999(97)01464-7.
- [78] E. A. Felinski and D. A. Antonetti, "Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression: Novel treatments for diabetic retinopathy," *Current Eye Research*. 2005, doi: 10.1080/02713680500263598.
- [79] D. A. Antonetti, E. B. Wolpert, L. DeMaio, N. S. Harhaj, and R. C. Scaduto, "Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin," *J. Neurochem.*, 2002, doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00740.x.
- [80] M. C. Gillies *et al.*, "Intravitreal triamcinolone prior to laser treatment of diabetic macular edema: 24-month results of a randomized controlled trial," *Ophthalmology*, 2011, doi: 10.1016/j.opthta.2010.09.029.
- [81] P. Massin *et al.*, "Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic diffuse macular edema: Preliminary results of a prospective controlled trial," *Ophthalmology*, 2004, doi: 10.1016/j.opthta.2003.05.037.
- [82] J. E. Chang-Lin *et al.*, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, doi: 10.1167/iovs.10-5285.

- [83] P. A. Pearson *et al.*, "Fluocinolone acetonide intravitreal implant for diabetic macular edema: A 3-year multicenter, randomized, controlled clinical trial," *Ophthalmology*, 2011, doi: 10.1016/j.opthta.2011.02.048.
- [84] Souto E, Fangueiro J, Müller R. Solid lipid nanoparticles (SLN™), in: I.F. Uchegbu, A.G. Schätzlein, W.P. Cheng, A. Lalatsa (Eds.), *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*, Springer, New York, 2013, pp. 91–116.
- [85] J. F. Fangueiro *et al.*, "A novel lipid nanocarrier for insulin delivery: Production, characterization and toxicity testing," *Pharm. Dev. Technol.*, 2013, doi: 10.3109/10837450.2011.591804.
- [86] J. F. Fangueiro, A. M. Silva, M. L. Garcia, and E. B. Souto, "Current nanotechnology approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2014.12.023.
- [87] C. Zhao, A. Tan, G. Pastorin, and H. K. Ho, "Nanomaterial scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering," *Biotechnology Advances*. 2013, doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.08.001.
- [88] J. Araújo, M. L. Garcia, M. Mallandrich, E. B. Souto, and A. C. Calpena, "Release profile and transscleral permeation of triamcinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers (TA-NLC): In vitro and ex vivo studies," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2012, doi: 10.1016/j.nano.2011.10.015.
- [89] J. Araújo, S. Nikolic, M. A. Egea, E. B. Souto, and M. L. Garcia, "Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2011, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.06.025.
- [90] E. Gonzalez-Mira, M. A. Egea, E. B. Souto, A. C. Calpena, and M. L. García, "Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery," *Nanotechnology*, 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/4/045101.
- [91] E. Gonzalez-Mira, M. A. Egea, M. L. Garcia, and E. B. Souto, "Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2010, doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.029.
- [92] E. B. Souto, S. Doktorovova, E. Gonzalez-Mira, M. A. Egea, and M. L. Garcia, "Feasibility of lipid nanoparticles for ocular delivery of anti-inflammatory drugs," *Current Eye Research*. 2010, doi: 10.3109/02713681003760168.
- [93] J. Araújo, E. Gonzalez-Mira, M. A. Egea, M. L. Garcia, and E. B. Souto, "Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetonide-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications," *Int. J. Pharm.*, 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.034.
- [94] H. Yang, P. Tyagi, R. S. Kadam, C. A. Holden, and U. B. Kompella, "Hybrid dendrimer hydrogel/PLGA nanoparticle platform sustains drug delivery for one week and antiglaucoma effects for four days following one-time topical administration," *ACS Nano*, 2012, doi: 10.1021/nn301873v.

- [95] C. A. Holden *et al.*, "Polyamidoamine dendrimer hydrogel for enhanced delivery of antiglaucoma drugs," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2012, doi: 10.1016/j.nano.2011.08.018.
- [96] J. F. Fangueiro *et al.*, "Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization and cytotoxicity," *Int. J. Pharm.*, 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.025.
- [97] M. Ali Attia Shafie, "Formulation and Evaluation of Betamethasone Sodium Phosphate Loaded Nanoparticles for Ophthalmic Delivery," *J. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2013, doi: 10.4172/2155-9570.1000273.
- [98] D. Pathak, P. Kumar, G. Kuppusamy, A. Gupta, B. Kamble, and A. Wadhvani, "Physicochemical characterization and toxicological evaluation of plant-based anionic polymers and their nanoparticulated system for ocular delivery," *Nanotoxicology*, 2014, doi: 10.3109/17435390.2013.834996.
- [99] X. L. Yan, E. Khor, and L. Y. Lim, "Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights," *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, doi: 10.1002/jbm.1029.
- [100] S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, and I. Nonaka, "Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration" *Polym Eng Sci* 1989; 59: 897-901.
- [101] Ohira *et al.*, "Topical dexamethasone γ -cyclodextrin nanoparticle eye drops increase visual acuity and decrease macular thickness in diabetic macular oedema," *Acta Ophthalmol.*, 2015, doi: 10.1111/aos.12803.
- [102] M. Tanito *et al.*, "Topical dexamethasone-cyclodextrin microparticle eye drops for diabetic macular edema," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, doi: 10.1167/iovs.11-8178.
- [103] Y. Lu *et al.*, "Effect of intravitreal injection of bevacizumab-chitosan nanoparticles on retina of diabetic rats," *Int. J. Ophthalmol.*, 2013, doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.01.01.
- [104] N. Elsaid, T. L. Jackson, Z. Elsaid, A. Alqathama, and S. Somavarapu, "PLGA microparticles entrapping chitosan-based nanoparticles for the ocular delivery of ranibizumab," *Mol. Pharm.*, 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00335.
- [105] S. Deguchi, H. Otake, Y. Nakazawa, N. Hiramatsu, N. Yamamoto, and N. Nagai, "Ophthalmic formulation containing nilvadipine nanoparticles prevents retinal dysfunction in rats injected with streptozotocin," *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, doi: 10.3390/ijms18122720.
- [106] J. Li *et al.*, "Preparation and evaluation of charged solid lipid nanoparticles of tetrandrine for ocular drug delivery system: Pharmacokinetics, cytotoxicity and cellular uptake studies," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2014, doi: 10.3109/03639045.2013.795582.
- [107] F. Lallemand, P. Daull, S. Benita, R. Buggage, and J.-S. Garrigue, "Successfully Improving Ocular Drug Delivery Using the Cationic Nanoemulsion, Novasorb," *J. Drug Deliv.*, 2012, doi: 10.1155/2012/604204.

- [108] M. Abrishami, S. Zarei-Ghanavati, D. Soroush, M. Rouhbakhsh, M. R. Jaafari, and B. Malaekheh-Nikouei, "Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration," *Retina*, 2009, doi: 10.1097/IAE.0b013e3181a2f42a.
- [109] J. M. Kaiser *et al.*, "Nanoliposomal minocycline for ocular drug delivery," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.03.004.
- [110] S. Rogers *et al.*, "The Prevalence of Retinal Vein Occlusion: Pooled Data from Population Studies from the United States, Europe, Asia, and Australia," *Ophthalmology*, 2010, doi: 10.1016/j.ophtha.2009.07.017.
- [111] P. R. A. O'Mahoney, D. T. Wong, and J. G. Ray, "Retinal vein occlusion and traditional risk factors for atherosclerosis," *Arch. Ophthalmol.*, 2008, doi: 10.1001/archophth.126.5.692.
- [112] Y. C. Yen, S. F. Weng, H. A. Chen, and Y. S. Lin, "Risk of retinal vein occlusion in patients with systemic lupus erythematosus: A population-based cohort study," *Br. J. Ophthalmol.*, 2013, doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-303265.
- [113] R. D. Sperduto *et al.*, "Risk factors for branch retinal vein occlusion," *Am. J. Ophthalmol.*, 1993, doi: 10.1016/S0002-9394(14)71345-5.
- [114] C. O. Fong and H. Schatz, "Central retinal vein occlusion in young adults," *Survey of Ophthalmology*. 1993, doi: 10.1016/0039-6257(93)90138-W.
- [115] N. L. B. Christoffersen and M. Larsen, "Pathophysiology and hemodynamics of branch retinal vein occlusion," *Ophthalmology*, 1999, doi: 10.1016/S0161-6420(99)90483-9.
- [116] S. S. Hayreh, M. B. Zimmerman, M. Beri, and P. Podhajsky, "Intraocular Pressure Abnormalities Associated with Central and Hemicentral Retinal Vein Occlusion," *Ophthalmology*, 2004, doi: 10.1016/j.ophtha.2003.03.002.
- [117] Glacet-Bernard *et al.*, "Obstructive sleep apnea among patients with retinal vein occlusion," *Arch. Ophthalmol.*, 2010, doi: 10.1001/archophthalmol.2010.272.
- [118] K. T. Chou *et al.*, "Sleep apnea and risk of retinal vein occlusion: A nationwide population-based study of Taiwanese," *Am. J. Ophthalmol.*, 2012, doi: 10.1016/j.ajo.2012.01.011.
- [119] J. M. Lahey *et al.*, "Laboratory evaluation of hypercoagulable states in patients with central retinal vein occlusion who are less than 56 years of age," *Ophthalmology*, 2002, doi: 10.1016/S0161-6420(01)00842-9.
- [120] M. Ip and A. Hendrick, "Retinal vein occlusion review," *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*. 2018, doi: 10.22608/APO.2017442.
- [121] H. K. Kuo, M. T. Kuo, Y. J. Chen, P. C. Wu, C. H. Chen, and Y. H. Chen, "The flicker electroretinogram interocular amplitude ratio is a strong prognostic indicator of neovascularization in patients with central retinal vein occlusion," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2010, doi: 10.1007/s00417-009-1205-4.

- [122] M. Rehak *et al.*, "Retinal gene expression and müller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, doi: 10.1167/iovs.08-2332.
- [123] P. Adamis and D. T. Shima, "The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease," *Retina*. 2005, doi: 10.1097/00006982-200502000-00001.
- [124] M. Funk *et al.*, "Intraocular concentrations of growth factors and cytokines in retinal vein occlusion and the effect of therapy with bevacizumab," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2009, doi: 10.1167/iovs.08-2510.
- [125] B. D. Kuppermann *et al.*, "Randomized controlled study of an intravitreal dexamethasone drug delivery system in patients with persistent macular edema," *Arch. Ophthalmol.*, 2007, doi: 10.1001/archoph.125.3.309.
- [126] The Branch Vein Occlusion Study Group, "Argon Laser Scatter Photocoagulation for Prevention of Neovascularization and Vitreous Hemorrhage in Branch Vein Occlusion," *Arch. Ophthalmol.*, 1986.
- [127] Lotery, X. Xu, G. Zlatava, and J. Loftus, "Burden of illness, visual impairment and health resource utilisation of patients with neovascular age-related macular degeneration: Results from the UK cohort of a five-country cross-sectional study," *Br. J. Ophthalmol.*, 2007, doi: 10.1136/bjo.2007.116939.
- [128] T. Y. A. Liu, A. R. Shah, and L. V. Del Priore, "Progression of lesion size in untreated eyes with exudative age-related macular degeneration: A meta-analysis using lineweaver-burk plots," *JAMA Ophthalmol.*, 2013, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.818
- [129] H. G. T. Blaauwgeers *et al.*, "Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris: Evidence for a trophic paracrine relation," *Am. J. Pathol.*, 1999, doi: 10.1016/S0002-9440(10)65138-3.
- [130] M. Nozaki *et al.*, "Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, doi: 10.1073/pnas.0408835103.
- [131] D. T. Bradley, P. F. Zipfel, and A. E. Hughes, "Complement in age-related macular degeneration: A focus on function," *Eye*. 2011, doi: 10.1038/eye.2011.37.
- [132] J. M. Thurman *et al.*, "Oxidative stress renders retinal pigment epithelial cells susceptible to complement-mediated injury," *J. Biol. Chem.*, 2009, doi: 10.1074/jbc.M808166200.
- [133] P. Mitchell, G. Liew, B. Gopinath, and T. Y. Wong, "Age-related macular degeneration," *The Lancet*. 2018, doi: 10.1016/S0140-6736(18)31550-2.
- [134] D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet, "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis," *Nature*, 1992, doi: 10.1038/359843a0.

- [135] P. J. Rosenfeld *et al.*, "Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *N. Engl. J. Med.*, 2006, doi: 10.1056/nejmoa054481.
- [136] D. M. Brown *et al.*, "Ranibizumab versus Verteporfin for Neovascular Age-Related Macular Degeneration," *N. Engl. J. Med.*, 2006, doi: 10.1056/nejmoa062655.
- [137] D. F. Martin *et al.*, "Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: Two-year results," *Ophthalmology*, 2012, doi: 10.1016/j.opthta.2012.03.053.
- [138] J. S. Heier *et al.*, "Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration," *Ophthalmology*, 2012, doi: 10.1016/j.opthta.2012.09.006.
- [139] S. Bamrungsap *et al.*, "Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system," *Nanomedicine*. 2012, doi: 10.2217/nnm.12.87.
- [140] S. Semkina *et al.*, "Multimodal doxorubicin loaded magnetic nanoparticles for VEGF targeted theranostics of breast cancer," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.04.019.
- [141] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, and Y. Xia, "Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy," *Angewandte Chemie - International Edition*. 2014, doi: 10.1002/anie.201403036.
- [142] L. He, J. Gu, L. Y. Lim, Z. X. Yuan, and J. Mo, "Nanomedicine-mediated therapies to target breast cancer stem cells," *Frontiers in Pharmacology*. 2016, doi: 10.3389/fphar.2016.00313.
- [143] P. Kaur and S. Kakkar, "Nanotherapy for posterior eye diseases," *J. Control. Release*, 2014, doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.031.
- [144] B. Yavuz, S.B. Pehlivan, I. Vural and N. Unlu, "In Vitro/In Vivo evaluation of dexamethasone—PAMAM dendrimer complexes for retinal drug delivery," *J Pharm Sci*. 2015; 104: 3814–3823
- [145] J. Han, D. Zhao, D. Li, X. Wang, Z. Jin, and K. Zhao, "Polymer-based nanomaterials and applications for vaccines and drugs," *Polymers*. 2018, doi: 10.3390/polym10010031.
- [146] C. I. C. Crucho and M. T. Barros, "Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods," *Materials Science and Engineering C*. 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.06.004.
- [147] M. Zamani, K. Rostamizadeh, H. K. Manjili and H. Danafar, "In vitro and in vivo biocompatibility study of folate-lysine-PEG-PCL as nanocarrier for targeted breast cancer drug delivery", *European Polymer Journal*, 2018; 103: 260-270.
- [148] Arias Jose, *Nanotechnology and Drug Delivery*. CRC press, 2016.
- [149] Y. Çırpanlı, "Kamptotesin İçeren Polimerik Ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi Ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi", Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2009.

- [150] S. Parveen and S. K. Sahoo, "Nanomedicine: Clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs," *Clin. Pharmacokinet.*, 2006, doi: 10.2165/00003088-200645100-00002.
- [151] C. Kutlu, "Çift Etkili Doku İskelesi - Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi Ve Beyin Tümörlerinin Tedavisinde Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2008.
- [152] Mark Saltzman W and S. Baldwin, "Materials for protein delivery in tissue engineering,," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998.
- [153] Neamtu, A. G. Rusu, A. Diaconu, L. E. Nita, and A. P. Chiriac, "Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications," *Drug Delivery*. 2017, doi: 10.1080/10717544.2016.1276232.
- [154] J. M. Ruiz-Moreno *et al.*, "Photodynamic therapy in subfoveal and juxtafoveal idiopathic and postinflammatory choroidal neovascularization," *Acta Ophthalmol. Scand.*, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0420.2006.00691.x.
- [155] P. Vishvakrama and S. Sharma, " Liposomes: an overview," *J Drug Delivery Ther.*, 2014;24:47-55.
- [156] R. Trivedi and U. B. Kompella, "Nanomicellar formulations for sustained drug delivery: Strategies and underlying principles," *Nanomedicine*. 2010, doi: 10.2217/nmm.10.10.
- [157] L. Klivanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, "Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes," *FEBS Lett.*, 1990, doi: 10.1016/0014-5793(90)81016-H.
- [158] C. Amrite and U. B. Kompella, "Size-dependent disposition of nanoparticles and microparticles following subconjunctival administration," *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, doi: 10.1211/jpp.57.12.0005.
- [159] B.K.Nanjwade, H.M. Bechra, G.K. Derkar, F.V. Manvi and V.K. Nanjwade, "Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems," *Eur J Pharm*, 2009, doi: 10.1016/j.ejps.2009.07.008.
- [160] E. De Salamanca *et al.*, "Chitosan nanoparticles as a potential drug delivery system for the ocular surface: Toxicity, uptake mechanism and in vivo tolerance," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006, doi: 10.1167/iovs.05-0495.
- [161] J. Jin *et al.*, "Anti-inflammatory and antiangiogenic effects of nanoparticle-mediated delivery of a natural angiogenic inhibitor," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, doi: 10.1167/iovs.10-6229.
- [162] İ. Özcan, "Kemiğe Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve In Vitro -In Vivo Değerlendirilmesi", Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 2008.
- [163] Y. N. Konan, R. Gurny, and E. Allémann, "Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(01)00944-9.

- [164] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi and Y. Kawashima, "Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticle," *Powder technology*, 2000, 107, 137-143.
- [165] T. Akagi, M. Baba, and M. Akashi, "Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine," *Advances in Polymer Science*. 2012, doi: 10.1007/12_2011_150.
- [166] M. Julienne, M. Alonso, J. Gomez Amoza and J. Benoit, "Preparation of poly (D, L-lactide/ glycolide) nanoparticles of controlled particle size distribution: application of experimental designs," *Drug development and industrial pharmacy*, 1992; 18, 1063-1077.
- [167] H. S. Yoo, J. E. Oh, K. H. Lee, and T. G. Park, "Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release," *Pharm. Res.*, 1999, doi: 10.1023/A:1018908421434.
- [168] M. S. Muthu, "Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview," *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009, doi: 10.4103/0973-8398.59948.
- [169] E. Allémann, J. C. Leroux, R. Gurny, and E. Doelker, "In Vitro Extended-Release Properties of Drug-Loaded Poly(DL-Lactic Acid) Nanoparticles Produced by a Salting-Out Procedure," *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.*, 1993, doi: 10.1023/A:1018970030327.
- [170] Mozaffari, Mahmood S. *New Strategies to Advance Pre/Diabetes Care: Integrative Approach by PPPM*, Springer, 2013.
- [171] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *Int. J. Pharm.*, 1989, doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0.
- [172] J.P. Rao, and K.E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters", *Progress in Polymer Science*. 2011, 36, 887-913.
- [173] K. Öztürk, "Serbest Radikal Temizleyici Madde İçeren Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve Değerlendirilmesi", Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 2010.
- [174] Y. P. Sun, M. J. Meziani, P. Pathak, and L. Qu, "Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution," *Chemistry - A European Journal*. 2005, doi: 10.1002/chem.200400422.
- [175] Engineer, J. Parikh, and A. Raval, "Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system," *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 2011.
- [176] Yewale *et al.*, "Docetaxel loaded immunonanoparticles delivery in EGFR overexpressed breast carcinoma cells," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 2018, doi: 10.1016/j.jddst.2018.03.027.

- [177] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. Chen, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical Cancer Research*. 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.
- [178] R. Dinarvand, N. Sepehri, S. Manoochehri, H. Rouhani, and F. Atyabi, "Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents," *International journal of nanomedicine*. 2011, doi: 10.2147/ijn.s18905.
- [179] P. Mittal *et al.*, "Formulation, optimization, hemocompatibility and pharmacokinetic evaluation of PLGA nanoparticles containing paclitaxel," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2019, doi: 10.1080/03639045.2018.1542706.
- [180] Ullah, G. Cosar, E. S. Abamor, M. Bagirova, Z. K. Shinwari, and A. M. Allahverdiyev, "Comparative study on the antileishmanial activities of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles (AgNPs)," *3 Biotech*, 2018, doi: 10.1007/s13205-018-1121-6.
- [181] K. A. Singh Gurpreet, Kaur Tanurajvir, Kaur Ravinder, "Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA," *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.* [ISSN2394-613X], 2014, doi: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.679.2373&rep=rep1&type=pdf>.
- [182] A.M. Allahverdiyev, *Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri*, Nobel Tıp Kitabevleri, 2018.
- [183] T. U. Krohne, Z. Liu, F. G. Holz, and C. H. Meyer, "Intraocular pharmacokinetics of ranibizumab following a single intravitreal injection in humans," *Am. J. Ophthalmol.*, 2012, doi: 10.1016/j.ajo.2012.03.047.
- [184] R. L. Avery *et al.*, "Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular amd," *Br. J. Ophthalmol.*, 2014, doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305252.
- [185] R. Bhagat, J. Zhang, S. Farooq, and X. Y. Li, "Comparison of the release profile and pharmacokinetics of intact and fragmented dexamethasone intravitreal implants in rabbit eyes," *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, 2014, doi: 10.1089/jop.2014.0082.
- [186] L. Xu *et al.*, "Pharmacokinetics of ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration: A population approach," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013, doi: 10.1167/iovs.12-10260.
- [187] R. L. Avery *et al.*, "Systemic pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravitreal aflibercept, bevacizumab, and ranibizumab," *Retina*, 2017, doi: 10.1097/IAE.0000000000001493.
- [188] J. B. Christoforidis *et al.*, "Systemic biodistribution and intravitreal pharmacokinetic properties of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in a nonhuman primate model," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2017, doi: 10.1167/iovs.17-22431.
- [189] M. Brown, M. Michels, P. K. Kaiser, J. S. Heier, J. P. Sy, and T. Ianchulev, "Ranibizumab versus Verteporfin Photodynamic Therapy for Neovascular

- Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Results of the ANCHOR Study,” *Ophthalmology*, 2006, doi: 10.1016/j.optha.2008.10.018.
- [190] M. Okada, R. Kandasamy, E. W. Chong, M. McGuiness, and R. H. Guymer, “The Treat-and-Extend Injection Regimen Versus Alternate Dosing Strategies in Age-related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-analysis,” *Am. J. Ophthalmol.*, 2018, doi: 10.1016/j.ajo.2018.05.026.
- [191] Haga, T. Kawaji, R. Ideta, Y. Inomata, and H. Tanihara, “Treat-and-extend versus every-other-month regimens with aflibercept in age-related macular degeneration,” *Acta Ophthalmol.*, 2018, doi: 10.1111/aos.13607.
- [192] W. M. Al-Zamil and S. A. Yassin, “Recent developments in age-related macular degeneration: A review,” *Clinical Interventions in Aging*. 2017, doi: 10.2147/CIA.S143508.
- [193] Y. Tanetsugu, T. Tagami, T. Terukina, T. Ogawa, M. Ohta, and T. Ozeki, “Development of a sustainable release system for a ranibizumab biosimilar using poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable polymer-based microparticles as a platform,” *Biol. Pharm. Bull.*, 2017, doi: 10.1248/bpb.b16-00437.
- [194] X. P. Zhang *et al.*, “Effect of nanoencapsulation using poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) on anti-angiogenic activity of bevacizumab for ocular angiogenesis therapy,” *Biomed. Pharmacother.*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.092.
- [195] Sousa, A. Cruz, I. M. Pinto, and B. Sarmento, “Nanoparticles provide long-term stability of bevacizumab preserving its antiangiogenic activity,” *Acta Biomater.*, 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.040.
- [196] S. J. Kelly *et al.*, “Aflibercept nanoformulation inhibits VEGF expression in ocular in vitro model: A preliminary report,” *Biomedicines*, 2018, doi: 10.3390/biomedicines6030092.
- [197] W. Liu, B. S. Lee, W. F. Mieler, and J. J. Kang-Mieler, “Biodegradable Microsphere-Hydrogel Ocular Drug Delivery System for Controlled and Extended Release of Bioactive Aflibercept In Vitro,” *Curr. Eye Res.*, 2019, doi: 10.1080/02713683.2018.1533983.
- [198] Q. Xu *et al.*, “Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo,” *J. Control. Release*, 2013, doi: 10.1016/j.jconrel.2013.01.018.
- [199] S. K. Li, M. R. Liddell, and H. Wen, “Effective electrophoretic mobilities and charges of anti-VEGF proteins determined by capillary zone electrophoresis,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, doi: 10.1016/j.jpba.2010.12.027.
- [200] S. S. Thakur, N. L. Barnett, M. J. Donaldson, and H. S. Parekh, “Intravitreal drug delivery in retinal disease: Are we out of our depth?,” *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.927864.
- [201] Gavini, M. C. Bonferoni, G. Rassa, A. Obinu, F. Ferrari, and P. Giunchedi, “Biodegradable Microspheres as Intravitreal Delivery Systems for Prolonged Drug Release. What is their Eminence in the Nanoparticle Era?,” *Curr. Drug Deliv.*, 2018, doi: 10.2174/1567201815666180226121020.

- [202] Z. Chu *et al.*, "Unambiguous observation of shape effects on cellular fate of nanoparticles," *Sci. Rep.*, 2014, doi: 10.1038/srep04495.
- [203] S. S. Rane and P. Choi, "Polydispersity index: How accurately does it measure the breadth of the molecular weight distribution?," *Chemistry of Materials*. 2005, doi: 10.1021/cm048594i.
- [204] Lin *et al.*, "Drug delivery nanoparticles: Toxicity comparison in retinal pigment epithelium and retinal vascular endothelial cells," *Seminars in Ophthalmology*. 2016, doi: 10.3109/08820538.2015.1114865.
- [205] E. Sakurai, H. Ozeki, N. Kunou, and Y. Ogura, "Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics," *Ophthalmic Res.*, 2001, doi: 10.1159/000055638.
- [206] M. Saenz-De-Viteri *et al.*, "Single- and repeated-dose toxicity study of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions," *Biochem. Pharmacol.*, 2016, doi: 10.1016/j.bcp.2015.12.017.
- [207] D. Malik *et al.*, "Safety profiles of anti-VEGF drugs: Bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture," *Br. J. Ophthalmol.*, 2014, doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305302.
- [208] L. Parisi, R. Fuhrer, M. Zinkernagel, and V. Enzmann, "Ranibizumab and bevacizumab but not aflibercept inhibit proliferation of primary human retinal pigment epithelium in vitro," *Ophthalmologica*, 2019, doi: 10.1159/000490430.
- [209] L. Yu, X. H. Liang, and N. Ferrara, "Comparing protein VEGF inhibitors: In vitro biological studies," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.014.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

İletişim Bilgisi:

Konferans Bildirileri

1. Işıl Kutlutürk Karagöz 'Retina Hastalıklarının Tedavisinde Kullanılmak Üzere Aflibercept Temelli Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Erken Dönem Sonuçlarının Değerlendirilmesi,' [EP-677], TOD 54. Ulusal Kongresi, 2020.

Projeler

1. Işıl Kutlutürk Karagöz, Adil Allahverdiyev, Atıfcan Demircioğlu, Emrah Şefik Abamor, Sahar Dinparvar, Melehat Bağirova 'Producing Aflibercept Loaded Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) Nanoparticles as a New Ocular Drug Delivery System and Its Challenges,' Fresenius Environmental Bulletin, 2020, Reference-No.: FEB_20_02177, (Basım aşamasında).

2. Kutlutürk Karagöz, I., Allahverdiyev, A., Bağirova, M., Abamor, E.Ş., Dinparvar, S., 2020. Current Approaches in Treatment of Diabetic Retinopathy and Future Perspectives. J Ocul Pharmacol Ther. 2020 Sep;36(7):487-496. doi: 10.1089/jop.2019.0137.