



Retina Pigment Epiteli Hücre Kültürüne Anti-Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İlaçlarının Etkilerinin Değerlendirilmesi

The Effects of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Drugs on Retinal Pigment Epithelial Cell Culture

✉ Mustafa Şahiner*, ✉ Dilek Bahar**, ✉ Ayşe Öner*, ✉ Zeynep Burçin Gönen***, ✉ Metin Ünlü*, ✉ Duygu Gülmez Sevim*, ✉ Çağatay Karaca*, ✉ Galip Ertuğrul Mirza*

*Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

**Erciyes Üniversitesi Betül-Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri, Türkiye

***Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Oral/Maksillofasyal Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Öz

Amaç: Retina pigment epiteli hücre kültürüne anti-vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ilaçların etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Yeni Zelanda beyaz tavşanlarından enükleasyon yöntemi ile elde edilen gözlerden izole edilen retina pigment epitel hücrelerinden oluşturulan hücre kültürlerine aflibercept (0,5 mg/mL), bevacizumab (0,3125) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) dozlarında uygulandı. Yetmiş iki saat sonunda ilaçların kontrol grubunda ve ilaç uygulaması yapılan kültürlerde canlılık, apoptozis, proliferasyon ve senesans olan etkileri değerlendirildi.

Bulgular: Aflibercept uygulanan kültürde hem kontrol grubuna göre hem de bevacizumab ve ranibizumab uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptoziste azalma ve canlılıkta artış olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Bevacizumab ve ranibizumab uygulanan gruba ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptoziste artış ve canlılıkta azalma olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Proliferasyon ve senesans üzerine etkileri değerlendirildiğinde anti-VEGF ilaç uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında herhangi bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: Anti-VEGF ilaçların proliferasyon ve senesans üzerine herhangi bir etkisi gözlenmedi. Afliberceptin apoptozisi azaltarak hücre canlılığını artırdığı, ranibizumab ve bevacizumabın ise apoptozisi artırarak canlılığı azalttığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anti-VEGF, hücre kültürü, senesans, retina pigment epitel hücresi

Abstract

Objectives: To assess the effects of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs on retinal pigment epithelium cell culture.

Materials and Methods: Aflibercept (0.5 mg/mL), bevacizumab (0.3125 mg/mL), and ranibizumab (0.125 mg/mL) were applied to retinal pigment epithelium cell cultures isolated from the enucleated eyes of New Zealand white rabbits. Viability, apoptosis, proliferation, and senescence of the cells were evaluated in control and drug-treated cultures at the end of 72 hours.

Results: Cells treated with aflibercept showed increased viability and decreased apoptosis compared to the control culture and both the bevacizumab- and ranibizumab-treated groups ($p<0.05$). Statistically increased apoptosis and decreased viability were found in the bevacizumab and ranibizumab-treated groups compared with the control group ($p<0.05$). There were no statistically significant differences in cell proliferation and senescence between the groups ($p>0.05$).

Conclusion: Anti-VEGF drugs did not affect senescence or proliferation of retinal pigment epithelium cells. Aflibercept was found to decrease apoptosis and increase cell viability, while ranibizumab and bevacizumab increased apoptosis and reduced cell viability in retinal pigment epithelium culture.

Keywords: Anti-VEGF, cell culture, senescence, retinal pigment epithelial cell

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Metin Ünlü, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Tel.: +90 536 830 59 72 E-posta: drunlmetin@hotmail.com **ORCID-ID:** orcid.org/0000-0003-2505-9853

Geliş Tarihi/Received: 21.11.2017 **Kabul Tarihi/Accepted:** 02.03.2018

©Telif Hakkı 2018 Türk Oftalmoloji Derneği
Türk Oftalmoloji Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

Giriş

Vasküler endotelial büyüme faktörü A'nın (VEGF-A), anjiyogenezin ana mediyatörü olduğu ve retinanın vasküler hastalıklarında vasküler geçirgenliğin artması ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir.^{1,2,3,4} VEGF'nin inhibisyonu, deneysel ve klinik çalışmaların odak noktası olmuştur. Farklı anti-VEGF ajanların intravitreal uygulamasının farklı nedenler ortaya çıkan maküla ödemi tedavisindeki etkinliği iyi bilinmektedir.⁵ Bu ilaçlar intravitreal uygulandığında karmaşık bir etki mekanizmasına sahiptir ve çeşitli VEGF tiplerini bloke edilmesi, yeni oluşan kan damarı duvarlarının geçirgenliğini azaltılması ve retina tabakalarında ödemin azaltılmasını içerir. Son yıllarda, anti-VEGF ilaçlarının farklı hücre kültürleri üzerindeki *in vitro* etkisi gösterilmiştir.^{6,7,8,9,10,11} Amacımız, anti-VEGF ilaçların *in vitro* bir model olan retinal pigment epiteli (RPE) hücre kültüründe canlılık, apoptoz, proliferasyon ve senesans üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

Bu çalışmada, RPE hücre kültüründe aflibercept (0,5 mg/mL), bevacizumab (0,3125) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) tedavilerinin proliferatif ve sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması amacıyla kontrol grubu ve ilaç uygulaması yapılan kültürlerde 72 saat sonunda canlılık, apoptozis, proliferasyon ve senesense değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

Hayvanlar

Gözler, ağırlıkları 1,5 ila 2,2 kg arasında değişen 4 Yeni Zelanda beyaz tavşanından elde edildi. Hayvan bakımı ve cerrahi girişimler için Erciyes Üniversitesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (TTU-2015-5996). Tavşanlar yüksek doz ketamin/ksilazin enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Gözle, enüklasyon işleminden sonra penisilin/streptomisin (GIBCO, 15140-0122) eklenmiş Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen fosfat tamponlu salin (PBS) içine alındı.

Tavşan Retinal Pigment Epitelinin İzolasyonu ve Kültürü

Tavşan RPE hücreleri, Chang ve ark.¹² tarafından tarif edildiği gibi izole edildi ve saklandı. Gözler %2 dispaz ile 15 dakika inkübe ettikten sonra, limbustan 3 mm uzaklıkta bir insizyon yapıldı ve insizyona dairesel olarak devam edildi. Kornea ve lens çıkartıldıktan sonra, arka segmentte 4 radyal insizyon yapıldı ve bu kısım %10 fetal sıgır serumu eklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's besiyeri/Ham's F12 ortamında 2 saat süreyle inkübe edildi. Son olarak, RPE hücreleri, mikropipetlerle nöral retina ve koroid dokusundan bir tabaka olarak ayrıldı ve bir steromikroskop altında (Olympus BX51, Japonya) incelendi. Çalışma için 3. pasaj hücreleri kullanıldı ve ilaç uygulamaları hücreler ekildikten 24 saat sonra yapıldı.

VEGF-A'ya karşı geliştirilmiş olan bir insan monoklonal antikorunun bir parçası olan ve VEGF-A ve izoformlarına (VEGF110, VEGF121 ve VEGF165) seçici olarak bağlanan ranibizumab (Lucentis, Novartis, İsviçre) 0,125 mg/mL konsantrasyonda uygulandı. Çeşitli göz hastalıklarının tedavisinde endikasyon dışı kullanılan, VEGF'ye karşı bir monoklonal antikor olan Bevacizumab (Avastin, Genetech/

Roche, ABD), hücre kültürlerine 0,3125 mg/mL konsantrasyonda eklendi. Dolaşımdaki VEGF (alt tipleri VEGF-A ve VEGF-B) ve plasental büyüme faktörüne (PGF) bağlanan bir füzyon proteini olan Aflibercept (Eylea, Bayer Health Care, Almanya), 0,5 mg/mL konsantrasyonda kullanıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünofloresan boyama için, RPE hücreleri %0,4 paraformaldehid içeren PBS ile fiksle edildi ve %0,4 Triton X-100 ile permeabilize edildi. Blokasyon için sıgır serum albümini (10 mg/mL) kullanıldı. Hücreler, bir gece boyunca primer antikorla (zonula occludens protein 1 [ZO-1] invitrogen, 330100 ve sitokeratin 18 chemicon, MAB3234) inkübe edildi. İşaretlenen hücreler, sekonder antikorlar ile 1 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyonlardan sonra hücreler her yıkama 5 dakika olacak şekilde 3-5 kez PBS ile yıkandı ve floresan mikroskop (Olympus BX51, Japonya) altında değerlendirildi.

MTT Proliferasyon Analizi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek için kullanılan kabul gören bir yöntemdir ve hücre canlılığının ölçülmesi için yararlı olabilir. RPE hücrelerinin metabolik aktivitesini değerlendirmek için daha önce bildirilen yöntem ile MTT analizi yapıldı.¹³ Besi ortamı uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı, her kuyucua 1000 mikrolitre (uL) MTT çözeltisi ilave edildi ve hücreler 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edildi. Formazan kristalleri DMSO (1000 uL/kuyucuk) eklenerek çözüldü. Bir tarama spektrofotometresi (Promega Glomax MultiDetection System Plate okuyucu, ABD) ile 560 nm'de absorpsiyon değerlendirildi. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı. Aynı pasajın tedavi uygulanmayan RPE hücreleri kontrol olarak kullanıldı.

Senesansla İlişkili β -galaktosidaz Aktivitesi

Senesansla ilişkili (SA) β -galaktosidaz aktivitesi olan RPE hücrelerinin yüzdesi, daha önce Dimri ve ark.¹⁴ tarafından bildirilen yöntem ile saptandı. Kısaca, tedavi alan RPE hücreleri PBS ile iki kez yıkandı ve oda sıcaklığında 4 dakika süre ile %2 formaldehit ve %0,2 glutaraldehit içeren PBS (pH 6,0) ile fiksle edildi. Hücreler daha sonra iki kez PBS ile yıkandı ve 8 saat boyunca 37 °C'de taze hazırlanan SA-Gal boyama çözeltisi ile karanlıkta inkübe edildi. Son olarak, SA-Gal boyama çözeltisi uzaklaştırıldı, hücreler PBS ile yıkandı ve hücrelerde mavimsi renk gelişimi ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

Apoptozisin Saptanması

Hücrel yaşamsal indekslerin analiz edildiği aynı kültürlerde apoptoz düzeyi belirlendi. Apoptotik hücreler, Muse™ Annexin V&Dead Cell Kiti (MCH100105) ile üretici tarafından önerilen protokol kullanılarak saptandı. Hücreler ilk önce PBS ile yıkandı ve daha sonra 10 dakika tripsin uygulaması ile yüzeyden kaldırıldı ve tekrar PBS içinde süspanse edildi. Son olarak, hücreler santrifüje edildi (1400 rpm, 5 dakika) ve propidiumiyodür (1 ug/mL) içinde yeniden süspanse edildi. Apoptoz seviyesi, pre-G1 fazdaki apoptotik hücrelerin sayısı akış sitometresi ile (Millipore Muse® Cell Analyzer, Almanya) ile ölçülerek saptandı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Windows için SPSS sürüm 22,0 (Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Betimsel veriler ortalama ve standart deviasyon, ve yüzde olarak bildirildi. Bulgular tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi. P değerlerinin 0,05'ten küçük olması anlamlı kabul edildi. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı.

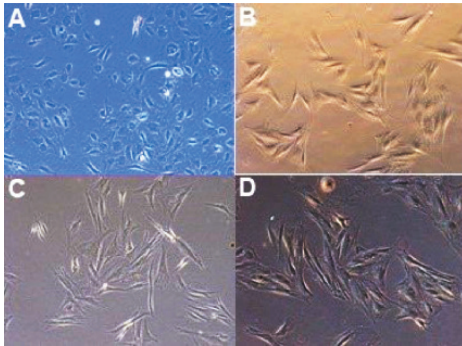
Bulgular

Retinal Pigment Epitel Hücre Morfolojisinin Değerlendirilmesi

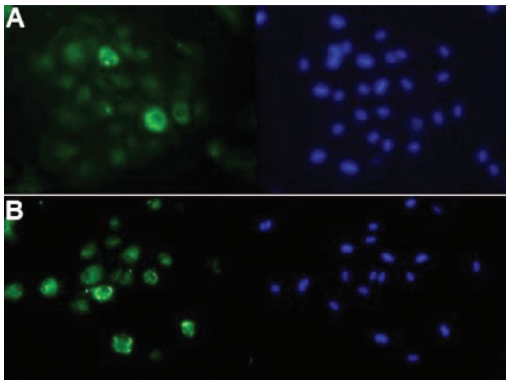
RPE hücrelerinin aflibercept (0,5 mg/mL), bevacizumab (0,3125 mg/mL) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) eklenmesinden 72 saat sonra ve kontrol kültürlerinde, hücrelerin faz kontrast görünümü karşılaştırıldığında, RPE hücrelerinde hiçbir tedavi grubunda morfolojik değişiklik gözlenmedi ve altıgen morfolojinin korunduğu görüldü (Şekil 1).

Sitokeratin 18 ve Zonula Occludens Protein 1 İfadesi

İmmünohistositokimya kesitlerinde RPE tabakalarında intermediate protein sitokeratin 18 (Şekil 2A) ve sıkı bağlantı proteini ZO-1 (Şekil 2B) ekspresyonu olduğu görüldü.



Şekil 1. Üç anti-vasküler endotelial büyüme faktörü ilaç uygulaması ve kontrol grubuna ait faz-kontrast mikroskopik görüntülerin karşılaştırılması: Yetmiş iki saat sonunda ilaç tedavileri retinal pigment epiteli (RPE) hücre kültüründe herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadı ve RPE hücreleri altıgen görünümünü korudular (A) kontrol grubu, (B) aflibercept (0,5 mg/mL), (C) bevacizumab (0,3125 mg/mL) ve (D) ranibizumab (0,125 mg/mL)



Şekil 2. Retinal pigment epiteli kültürünün immünohistokimya boyaması, sitokeratin 18 (A) ve sıkı bağlantı proteini zonula occludens protein 1 (B) ekspresyonunu göstermektedir

Anti-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Ajanlarının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Üç anti-VEGF ilacının 72 saatte sitotoksik etkilere neden olup olmadığını değerlendirmeye çalıştık. RPE hücre kültürleri %90 yoğunluğa ulaşana kadar beklendi ve sitotoksikite MTT analizi ile değerlendirildi. Aflibercept ile tedavi edilen kültürde kontrol ile kıyaslandığında hücrelerin canlılığının anlamlı düzeyde arttığı görüldü ($p=0,002$) (Şekil 3A). Bevacizumab ve ranibizumab ile tedavi edilen gruplarda ise kontrole göre hücre canlılığının anlamlı düzeyde azaldığı bulundu (sırasıyla $p=0,003$ ve $p=0,0001$) (Şekil 3A).

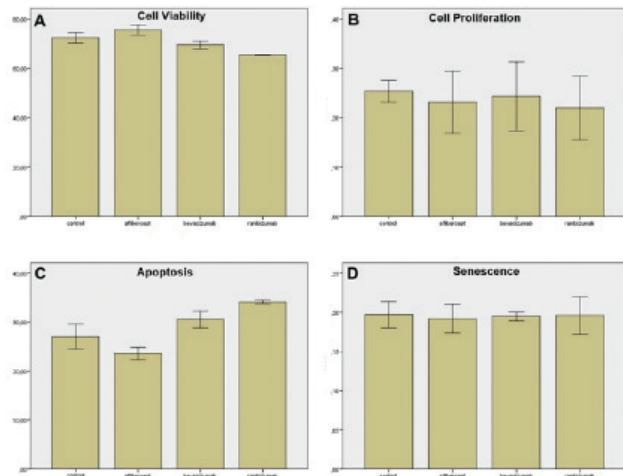
Retinal Pigment Epitel Hücrelerinin Proliferasyonu ve Apoptozu

Kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında 72 saat aflibercept (0,5 mg/mL), bevacizumab (0,3125 mg/mL) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) inkübasyonu hücre proliferasyonunu önemli ölçüde etkilemedi (Şekil 3B).

Kontrol grubuna göre bevacizumab (0,3125 mg/mL) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) ile tedavi edilen kültürlerde apoptoz oranları anlamlı düzeyde daha yüksekti (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,0001$). Aflibercept ile tedavi edilen hücrelerde apoptozis kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştı ($p=0,001$) (Şekil 3C).

Senesansla İlişkili β -galaktosidaz Aktivitesi

Hücre yaşlanması üzerine etkileri değerlendirildiğinde 72 saatte üç anti-VEGF ilaç arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 3D).



Şekil 3. Aflibercept (0,5 mg/mL), bevacizumab (0,3125 mg/mL) ve ranibizumab (0,125 mg/mL) eklenmesinden 72 saat sonra hücre canlılığı (A), hücre proliferasyonu (B), apoptoz (C) ve senesense (D) düzeylerini gösteren çubuk grafikler. A) Kontrol grubuna kıyasla bevacizumab ve ranibizumab hücre canlılığını azaltırken aflibercept artırdı; B) Anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ilaçların hiçbirisi, hücre proliferasyonu üzerinde anlamlı bir negatif etki göstermedi; C) Kontrol grubuna göre bevacizumab ve ranibizumab apoptozu artırırken, aflibercept anlamlı düzeyde azalttı; D) Anti-VEGF ilaçların hiçbirisi senesense üzerine anlamlı bir etki göstermedi

Tartışma

Çalışmamız literatürde *in vitro* RPE hücrelerinde anti-VEGF ilaçların senesense üzerine etkilerinin değerlendirildiği ve bu ajanların senesense üzerine anlamlı bir etkiye sahip olmadığını gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca, RPE morfolojisi ve proliferasyonunun, retina hastalıklarında en sık kullanılan anti-VEGF ajanlardan etkilenmediğini gösterdik. Ancak, aflibercept hücre canlılığını artırdı ve apoptozu azalttı; bevacizumab ve ranibizumab ise bunun tersi şekilde etki gösterdi.

Vazoproliferatif oküler hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli terapötik ajanlar intravitreal enjeksiyon yöntemi ile yaygın olarak uygulanmaktadır.¹⁵ İntravitreal olarak uygulanan mevcut anti-VEGF ilaçlar arasında, ranibizumab, aflibercept ile endikasyon dışı olarak bevacizumab yer almaktadır. Aflibercept ile diğer anti-VEGF ajanları arasındaki en önemli fonksiyonel fark, VEGF-A izoformlarına ek olarak VEGF-B, PGF1 ve PGF-2'yi bloke etmesidir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde ranibizumab, aflibercept ve bevacizumab'ın güvenilirliği ve etkinliğini değerlendiren sınırlı sayıda *in vitro* çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada afliberceptin apoptozu azalttığı ve hücre canlılığını artırdığı bulundu. Aksine, RPE kültürlerinde ranibizumab ve bevacizumabın apoptozu artırdığı ve hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Retina pigment epitelinden kaynaklanan VEGF, koryokapiller damarların desteklenmesi için hayati önemi olan bir araçtır. Bazı klinik çalışmalarda, subfoveal koroid kalınlığı ile RPE atrofi progresyonu arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu, anti-VEGF tedavisi sırasında kan akımının azalmasının RPE atrofisini arttırabileceğini düşündürmektedir.^{16,17} _ENREF_16_ENREF_17 Ayrıca, anti-VEGF ilaçların yan etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmaların çoğunun koryokapillaris içeren RPE hücre tabakası üzerinde gerçekleştirildiğini fark ettik. Çalışmamız izole RPE hücre serisi üzerinde gerçekleştirilmiştir ve anti-VEGF ilaçların RPE üzerindeki doğrudan toksik etkilerini gösterebilir. Yeni doğan tavşanlar ile yapılan bir çalışmada, Cam ve ark.¹⁸ enjeksiyondan 3 hafta sonra, tüm anti-VEGF ilaçlar ile elde edilen serum anti-VEGF konsantrasyonlarının düşük olduğunu ve dokuda apoptotik TUNEL (TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling) pozitif hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilen apoptotik indekse göre düşük düzeyde apoptozun indüklendiğini bildirmiştir. Malik ve ark.¹⁹ ayrıca insan RPE hücrelerinde çeşitli anti-VEGF ilaç konsantrasyonlarının güvenlik profillerini incelemiştir. Ranibizumab ve afliberceptin mitokondriyal toksisite veya hücre ölümüne neden olmadığını, bevacizumab ve afliberceptin düşük düzeyde mitokondriyal toksisite gösterdiğini ancak klinik dozlarda anlamlı hücre ölümüne neden olmadığını bildirmişlerdir. Ancak çalışmamızda, uygulanan tüm ilaçların hücre canlılığında anlamlı farka neden olduğu bulundu. Malik ve ark.¹⁹ kültür ortamına, klinik doz olarak kabul ettikleri konsantrasyonlarda anti-VEGF ilaçları ekleyerek, intravitreal enjekte edilen ilaç miktarının 4 mL insan vitreusunda eşit olarak dağıldığını varsaymışlar ve dozları buna göre değiştirmişlerdir. Çalışmamızda böyle bir değişiklik yapılmamıştır, bu bizim çalışmamızın kısıtlı olduğu bir yönüdür ve çelişen sonuçlarımızı açıklayabilir.

Çalışmamızda, anti-VEGF ilaçlarının 72 saatte RPE hücrelerinin senesense veya proliferasyonu üzerinde hiçbir etkisi izlenmedi. Hücre senesense, oksidatif stres, DNA hasarı, onkogen aktivitesi ve uygun olmayan kültür koşulları gibi çeşitli stres faktörlerine tepki olarak normal hücreler tarafından aktive edilen bir programdır.^{20,21} _ENREF_20_ENREF_21 genellikle, hücre senesense girdiklerinde, önemli morfolojik değişiklikler meydana gelir. Hücreler yayılır ve düzleşir; bunu genellikle, senesense ilişkili β galaktosidaz aktivitesinin artması izler.¹⁴ Bildiğimiz kadarıyla, literatürde anti-VEGF ilaçların senesense üzerine etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Sonuçlarımız 72 saatte çalışmada kullanılan anti-VEGF ilaçların RPE hücrelerinde senesense etki etmediğini gösterdi. Yakın zamanda, Zhuge ve ark.²² tarafından yapılan bir çalışmada etkin bir serbest radikal toplayıcı ve antioksidan olan fullerenolün, antioksidan etkisi aracılığı ile RPE hücrelerini oksidatif stres kaynaklı senesenseten koruyabileceği bildirmiştir. Fullerenolün koruyucu etkisinin, yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD) gibi oksidatif stres ile ilişkili retina hastalıklarında yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde çok önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, Kernt ve ark.²³ oksidatif streste, optik sinir başı astrosit (ONHA) hücrelerinde, yapısal olarak ubiquinon (koenzim Q10) ile ilişkili bir benzokinon türevi olan idebenonun antiapoptotik ve sitoprotektif etkilerini araştırmıştır. İdebenonun *in vitro* ONHA kültürlerinde senesense, oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızın kısıtlılıklarından biri, ilaçların hücrelerin daha önceden oksidatif strese maruz kaldığı RPE hücrelerinde senesense değişikliklerinin görüldüğü AMD gibi endike hastalık durumlarında değil, sağlıklı retinalarda değerlendirilmiş olmasıdır. Bu nedenle, oksidatif strese bağlı koşullarda ilaçların senesense etkileri hakkında bilgiye sahip değiliz.

Yakın zamanla Spitzer ve ark.⁸ bevacizumab, pegaptanib ve ranibizumabın farklı oküler hücrelerde antiproliferatif ve sitotoksik etkilerini karşılaştırmıştır. Koroidal epitel hücrelerine uygulandığında, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, hücre proliferasyonunda bevacizumab ve pegaptanib ile sırasıyla %38,2 ve %35,1 oranında azalma görülürken ranibizumab ile %44,1 oranında azalma izlenmiştir. Bevacizumab, pegaptanib ve ranibizumabın koroidal endotelial hücre proliferasyonunu önemli ölçüde baskıladığını bildirmişler ve mevcut belirlenen dozlarda kullanıldığında, ilaçların hiçbirinin endotelial hücre proliferasyonunun inhibisyonu açısından diğerlerinden daha üstün olmadığı sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda, ilaç uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında RPE hücre serisinin proliferasyon hızı açısından bir fark görülmedi.

Bir başka çalışmada, insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde (HUVEC) ranibizumab, pegaptanib ve bevacizumabın intravitreal doz aralığında etkileri karşılaştırılmıştır.¹⁰ Sonuçlar, ranibizumab ve bevacizumabın, RPE hücrelerinde elde ettiğimiz sonuçlarımıza benzer şekilde, HUVEC hücrelerinde apoptozu önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bu ilaçların, pegaptanib hariç, klinik olarak kullanılan dozları, kullanılan tüm konsantrasyonlarda sitotoksik

etki göstermeden hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, VEGF reseptörü-2'nin aktif formunun ekspresyonu, bevacizumab, ranibizumab ve pegaptanib ile inkübasyondan sonra kontrol değerlerinin sırasıyla %66, %78 ve %86'sına azalmıştır.

Schnichels ve ark.¹¹ çeşitli oküler hücrelerde (ARPE19, RGC-5 ve 661W) aflibercept, bevacizumab ve ranibizumabın sitotoksikite ve antiproliferatif aktivitesini değerlendirmiş ve afliberceptin araştırılan tüm konsantrasyon ve hücre serilerinde hücre morfolojisinde değişikliğe neden olmadığı, apoptozu indüklenmediği ve hücre canlılığında kalıcı azalmaya sebep olmadığı sonucuna varmışlardır. Ek olarak, afliberceptin, bazı VEGF ile ilişkili faktörlerin düşük düzeyde up-regülasyonuna ya da down-regülasyonuna neden olduğunu ancak ortaya çıkan değişikliklerin bevacizumab ve ranibizumab ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları ARPE19 hücre serisi insan RPE'den üretilmiştir, oysa bizim kullandığımız seri tavşan kaynaklıdır. VEGF-Trap_{R1R2} (aflibercept), tamamen insan sekansından oluşur ve insan VEGF izoformlarını bağlamak için tasarlanmıştır.²⁴ Holash ve ark.,²⁴ tamamen insan sekansına uyumlu olarak tasarlanmasına rağmen, VEGF-Trap_{R1R2}'nin test edilen tüm VEGF türlerini insandan tavuğa kadar tüm VEGF'leri bağladığını bildirmiş ancak çalışmalarında sadece fare, sıçan ve insanlarda elde edilen sonuçlara yer vermiştir. Bizim çalışmamız ile Schnichels ve ark.'nın¹¹ çalışmasında elde edilen çelişkili sonuçlar, çalışmalarda kullanılan farklı kökenden hücre serilerinin gösterdiği değişik yanıtlara bağlı olabilir.

AMD'li çoğu göz uzun süreli anti-VEGF tedavisi gerektirmektedir ve oküler homeostaz için çok önemli olan VEGF'nin sürekli nötralizasyonunun yan etkilere yol açabileceği bilinmektedir.²⁵

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın kısıtlamalarından biri, anti-VEGF ilaçların en sık olarak 3 aylık yükleme dozunu takiben aylık tekrarlayan enjeksiyonlar yapılması ya da gerektiğinde uygulanması gibi tekrar tekrar kullanılmasıdır. Aksine, çalışmamız sadece bir enjeksiyondan sonra ortaya çıkacak sonuçları temsil etmektedir ve gerçek hayatta olduğu gibi tekrarlanan enjeksiyonların etkilerini gösteren boylamsal çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

Sonuç olarak, çalışmamızda, anti-VEGF ilaçların RPE hücrelerinde senesense ve proliferasyonu üzerine etkili olmadığı görüldü. Afliberceptin apoptozu azalttığı ve hücre canlılığını artırdığı bulundu. Aksine, ranibizumab ve bevacizumabın apoptozu artırdığı ve RPE hücre canlılığını azalttığı gözlemlendi. Literatürde anti-VEGF ilaçların senesense üzerine etkilerini değerlendiren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın bu bağlamda gelecekteki araştırmalara yön vereceğine inanıyoruz. İn vitro bulgularımızı doğrulamak için deneysel ve prekliniik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 14/01/2015 tarihli 15/12 karar numarası ile alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: Zeynep Burçin Gönen, Mustafa Şahiner, Ayşe Öner, Konsept: Galip Ertuğrul Mirza, Ayşe Öner, Mustafa Şahiner, Zeynep Burçin Gönen, Dilek Bahar, Dizayn: Ayşe Öner, Mustafa Şahiner, Zeynep Burçin Gönen, Dilek Bahar, Veri Toplama veya İşleme: Zeynep Burçin Gönen, Dilek Bahar, Analiz veya Yorumlama: Zeynep Burçin Gönen, Dilek Bahar, Metin Ünlü, Duygu Gülmez Sevim, Çağatay Karaca, Literatür Arama: Metin Ünlü, Duygu Gülmez Sevim, Çağatay Karaca, Yazan: Metin Ünlü, Duygu Gülmez Sevim, Çağatay Karaca.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:10457-10461.
2. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*. 1997;57:4593-4599.
3. Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hassessian H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2408-2413.
4. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR; VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004;351:2805-2816.
5. Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, Jampol LM, Bressler NM, Bressler SB, Brucker AJ, Ferris FL, Hampton GR, Jhaveri C, Melia M, Beck RW; Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema: Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology*. 2016;123:1351-1359.
6. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis*. 2004;7:335-345.
7. Spitzer MS, Wallenfels-Thilo B, Sierra A, Yoeuruek E, Peters S, Henke-Fahle S, Bartz-Schmidt KU, Szurman P; Tuebingen Bevacizumab Study Group. Antiproliferative and cytotoxic properties of bevacizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:1316-1321.
8. Spitzer MS, Yoeuruek E, Sierra A, Wallenfels-Thilo B, Schraermeyer U, Spitzer B, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Comparative antiproliferative and cytotoxic profile of bevacizumab (Avastin), pegaptanib (Macugen) and ranibizumab (Lucentis) on different ocular cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007;245:1837-1842.
9. Kaempf S, Johnen S, Salz AK, Weinberger A, Walter P, Thumann G. Effects of bevacizumab (Avastin) on retinal cells in organotypic culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3164-3171.
10. Carneiro A, Falcao M, Pirrao A, Milheiro-Oliveira P, Falcao-Reis F, Soares R. Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2009;88:522-527.
11. Schnichels S, Hagemann U, Januschowski K, Hofmann J, Bartz-Schmidt KU, Szurman P, Spitzer MS, Aisenbrey S. Comparative toxicity and proliferation

- testing of aflibercept, bevacizumab and ranibizumab on different ocular cells. *Br J Ophthalmol*. 2013;97:917-923.
12. Chang CW, Roque RS, Defoe DM, Caldwell RB. An improved method for isolation and culture of pigment epithelial cells from rat retina. *Curr Eye Res*. 1991;10:1081-1086.
13. Kernt M, Neubauer AS, Liegl RG, Hirneiss C, Alge CS, Wolf A, Ulbig MW, Kampik A. Sorafenib prevents human retinal pigment epithelium cells from light-induced overexpression of VEGF, PDGF and PlGF. *Br J Ophthalmol*. 2010;94:1533-1539.
14. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:9363-9367.
15. Avery RL, Bakri SJ, Blumenkranz MS, Brucker AJ, Cunningham ET Jr, D'Amico DJ, Dugel PU, Flynn HW Jr, Freund KB, Haller JA, Jumper JM, Liebmann JM, McCannel CA, Mieler WF, Ta CN, Williams GA. Intravitreal injection technique and monitoring: updated guidelines of an expert panel. *Retina*. 2014;34(Suppl 12):1-18.
16. Cho HJ, Kim HS, Yoo SG, Han JI, Lew YJ, Cho SW, Lee TG, Kim JW. Retinal Pigment Epithelial Tear After Intravitreal Ranibizumab Treatment for Retinal Angiomatous Proliferation. *Am J Ophthalmol*. 2015;160:1000-1005.
17. Hata M, Yamashiro K, Oishi A, Ooto S, Tamura H, Miyata M, Ueda-Arakawa N, Kuroda Y, Takahashi A, Tsujikawa A, Yoshimura N. Retinal Pigment Epithelial Atrophy after Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Injections for Retinal Angiomatous Proliferation. *Retina*. 2017;37:2069-2077.
18. Cam D, Berk AT, Micili SC, Kume T, Ergur BU, Yilmaz O. Histological and Immunohistochemical Retinal Changes Following the Intravitreal Injection of Aflibercept, Bevacizumab and Ranibizumab in Newborn Rabbits. *Curr Eye Res*. 2017;42:315-322.
19. Malik D, Tarek M, Caceres del Carpio J, Ramirez C, Boyer D, Kenney MC, Kuppermann BD. Safety profiles of anti-VEGF drugs: bevacizumab, ranibizumab, aflibercept and ziv-aflibercept on human retinal pigment epithelium cells in culture. *Br J Ophthalmol*. 2014;98(Suppl 1):11-16.
20. Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4337-4341.
21. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997;88:593-602.
22. Zhuge CC, Xu JY, Zhang J, Li W, Li P, Li Z, Chen L, Liu X, Shang P, Xu H, Lu Y, Wang F, Lu L, Xu GT. Fullerenol protects retinal pigment epithelial cells from oxidative stress-induced premature senescence via activating SIRT1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:4628-4638.
23. Kernt M, Arend N, Buerger A, Mann T, Haritoglou C, Ulbig MW, Kampik A, Hirneiss C. Idebenone prevents human optic nerve head astrocytes from oxidative stress, apoptosis, and senescence by stabilizing BAX/Bcl-2 ratio. *J Glaucoma*. 2013;22:404-412.
24. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:11393-11398.
25. Kuroda Y, Yamashiro K, Tsujikawa A, Ooto S, Tamura H, Oishi A, Nakanishi H, Miyake M, Yoshikawa M, Yoshimura N. Retinal Pigment Epithelial Atrophy in Neovascular Age-Related Macular Degeneration After Ranibizumab Treatment. *Am J Ophthalmol*. 2016;161:94-103.