

Prematüre Retinopatisinde Güncel Moleküler ve Genetik Gelişmeler

Current Molecular and Genetic Advances in the Retinopathy of Prematurity

Ümeyye TAKA AYDIN¹, Osman ÇEKİÇ²

ÖZ

Prematüre retinopatisi, tıbbi ve teknolojik gelişmelere rağmen gelişmiş ülkelerde çocukluk çağı görme kayıplarının başlıca nedenlerinden biridir. Benzer klinik özelliklere sahip preterm bebeklerde prematüre retinopatisinin farklı şekillerde seyretmesi, hastalığın etiopatogenezinde çevresel faktörlerin dışında genetik faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir. Prematüre retinopatisi ile ilgili genetik araştırmalar genelde oksijenle indüklenmiş retinopatili hayvan modellerinde yapılmakta ve bu modellerin kullanılması hastalığın daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu derlemede, prematüre retinopatisi gelişiminde rol oynadığı düşünülen moleküler faktörler, genetik mutasyon ve polimorfizmlerin gözden geçirilmesini amaçladık. Prematüre retinopatisinin moleküler mekanizmasının anlaşılabilmesi, hastalığın tanı ve tedavisi için yeni ajanların geliştirilmesinde çok önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Prematüre retinopatisi, moleküler faktörler, genetik.

ABSTRACT

Despite significant medical and technological advances, retinopathy of prematurity is one of the major causes of visual loss in childhood in developed countries. Retinopathy of prematurity follows the different patterns of clinical courses at preterm infants with similar clinical features. This suggests genetic factors play role in the etiopathogenesis of the diseases such as environmental factors. Genetic researches on retinopathy of prematurity are usually carried out in animal models of oxygen induced retinopathy, and the use of these models provides a better understanding of the disease. In this article, we aimed to review the molecular factors, genetic mutations and polymorphisms that are thought to play a role in the development of retinopathy of prematurity. Understanding of the molecular mechanism in retinopathy of prematurity is extremely important in the development of new agents for the diagnosis and treatment of disease.

Key Words: Retinopathy of prematurity, molecular factors, genetic.

- 1- M.D. Asistant, Marmara University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, İstanbul/TURKEY
TAKA AYDIN U., uummutak@yahoo.com
- 2- M.D. Professor, Marmara University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, İstanbul/TURKEY
CEKIC O., ocekic@hotmail.com

Geliş Tarihi - Received: 14.03.2013
Kabul Tarihi - Accepted: 02.05.2013
Ret-Vit 2013;21:145-153

Yazışma Adresi / Correspondence Address: M.D. Asistant,
Umeyye TAKA AYDIN
Marmara University Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology,
İstanbul/TURKEY

Phone: +90 554 858 30 36
E-Mail: uummutak@yahoo.com

GİRİŞ

Prematüre retinopatisi (PR), düşük doğum ağırlıklı prematüre bebekleri etkileyen vasküler vitreoretinopati ile karakterize bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde çocukluk çağı görme kayıplarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. İlk kez 1942 yılında Terry tarafından lensin arkasında damarların ve fibroblastik dokunun gelişmesi olarak tanımlanmıştır.¹

PR sıklığı, doğum ağırlığı 1251 gramdan daha az olan preterm bebeklerde %65.8 ile %68 arasında (Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity ve Early Treatment for Retinopathy of Prematurity) değişen oranlarda olduğu bildirilmektedir.^{2,3} Özellikle yenidoğan yoğun bakımlardaki tıbbi ve teknolojik gelişmeler, prematüre bebek sıklığında artışa ve çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşatılmasına neden olmaktadır. Bu durum son zamanlarda tanımlanan agresif posterior PR gibi ciddi bir sorunu da yanında getirmektedir.

Benzer klinik özelliklere sahip bebeklerden bazılarında agresif posterior PR gibi ciddi bir durum görülürken, bazılarında PR kendiliğinden gerilemekte ve bazılarında ise hiç ortaya çıkmamaktadır. Bu durum çevresel faktörlerin dışında genetik faktörlerin olabileceğini gündeme getirmiştir.⁴ Günümüzde; çevresel faktörlerden cinsiyet, etnik köken, oküler pigmentasyon gibi durumlar incelenirken, moleküler düzeyde de vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) gibi proanjiyogenik faktörler ile Norrie hastalığı genindeki mutasyonlar araştırılmaktadır.

PR tedavisinde lazer ve kriyoterapi uzun zamandır kullanılmasına rağmen fonksiyonel olarak sonuçlar arzulan düzeyde değildir. Son zamanlarda alternatif olarak intravitreal anti-VEGF kullanılmakta ve başarılı sonuçlar rapor edilmektedir.⁵ Ancak, hem bu ajanların uzun dönem sonuçlarının bilinmemesi hem de VEGF'in nöroprotektif etkisi, araştırmacıları farklı tedavi seçeneklerinin araştırılmasına yöneltmektedir. PR'nin moleküler ve genetik temelini daha iyi anlaşılmasıyla, geliştirilecek farmakolojik ajanların PR tedavisinde oldukça etkili olabileceği düşünülmektedir.

PR, vazooobliterasyon ve vazoproliferasyon olmak üzere iki faz şeklinde oluşmaktadır. Birinci faza hiperoksi, ikinci faza ise hipoksi neden olmaktadır. Her iki fazın gelişiminde hiperoksi ve hipoksi tarafından uyarılan büyüme faktörleri ya da faktör düzenleyicileri mevcuttur. PR'nin patofizyolojisinde rol oynayan bu faktörler genelde oksijene bağımlı ve bağımsız olarak iki gruba ayrılır ve çoğunluğu oksijene bağımlıdır. Oksijene bağımlılar VEGF, eritropoetin (EPO), HIF-1 gibi pro-anjiyogenik faktörler iken oksijenden bağımsız olana da IGF-1 örnek verilebilir.

Oksijen ile İndüklenmiş Retinopatili Hayvan Modelleri

PR ile ilgili genetik araştırmalar genelde oksijenle indüklenmiş retinopatisi (OIR) olan hayvan modellerinde yapılmaktadır ve bu modellerin kullanılması hastalığın mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. OIR, yenidoğan farelere belli oran ve sürelerde hipoksi ve hiperoksi pompalanarak elde edilir. Böylece retina patolojilerine müdahale etme ve farklı tedavi seçenekleri deneme mümkün olabilmektedir. Yenidoğan hayvanlar öncelikle hiperoksik ortama alınır, bu dönemde vazooobliterasyon ve periferik avasküler retina oluşur, daha sonra hipoksik ortam ya da normal oda ortamına alınan farelerde neovaskülarizasyon gelişir.⁶ Böylece PR'de oluşan fazlara uygun (faz1 ve faz2) retinopati elde edilir.^{7,8}

PR Gelişiminde Risk Faktörleri ve Genetiğin Rolü

Düşük doğum ağırlığı ve erken doğum, PR gelişiminde en önemli risk faktörleridir. Oksijen, özellikle de arteriyel oksijen düzeyindeki dalgalanmalar, retinada anormal vaskülarizasyon oluşumunda kritik öneme sahiptir.⁷ OIR yenidoğan farelerin hiperoksik ortamda kalma süreleri arttıkça, retinanın periferik avasküler sahasında neovaskülarizasyona doğru giden bir süreç gelişmektedir.

Bu durumun anlaşılmasından sonra, preterm bebeklere düşük oksijen saturasyonu verilmeye başlanmıştır. Ancak bu durum, PR gelişimini azaltırken preterm bebeklerde görülen respiratuar distres sendromu gibi oksijen tedavisi gerektiren hastalıkların görülmesinde ise artışa neden olmuştur. Ayrıca intraventriküler kanama ile periventriküler lökomalazi, hipokarbi ile hiperkarbi, sepsis, çoğul gebelik, kan transfüzyonu gibi pek çok durumun PR gelişimini etkilediğine dair kanıtlar mevcuttur.

Aynı ve farklı yumurta ikizlerinde yapılan bir çalışmada PR gelişiminde genetik yatkınlık oranının %70 'lere kadar ulaşabileceği rapor edilmiştir.⁹ PR'nin genetik yatkınlığına dair kanıtlar güçlü olmasına rağmen, sebep olan genler, moleküller veya yolaklar halen keşfe ve aydınlatılmaya muhtaçtır.

PR'de Etnik Faktörler

PR, beyaz preterm bebeklerde, siyahılara kıyasla daha yüksek oranda gelişir.² PR, Asyalı bebeklerde daha ağır seyreder, Alaskalı bebeklerde de Asyalı bebeklere göre daha sık eşik PR görülür. Bu da etnik ve genetik faktörlerin PR gelişiminde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. Peter ve ark., farklı fare türleriyle yaptıkları bir çalışmada, yoğun pigmente farelerdeki OIR duyarlılığının, albino farelerin çok daha fazla olması sebebiyle, etnik kökenden kaynaklanan bu farklılığının oküler pigmentasyon ile alakalı olabileceğini ileri sürmektedirler.⁶

PR'de Polimorfizm ve Mutasyonların Rolü

PR gelişiminde genetiğin rolü olabileceği düşüncesi bu konuda çok sayıda çalışma yapılmasına neden olmuştur. Anormal vaskülarizasyona yada PR'ne sebep olabilecek genlerdeki polimorfizm yada mutasyonlarda istatistiksel ilişki saptansa da hastalığın kesin sebebine dair kanıtlar henüz yetersizdir. Genetik polimorfizm konusunda en sık olarak incelenen popüler gen VEGF'dir.⁴

PR GELİŞİM MEKANİZMASINDA ROL OYNAYAN BAŞLICA FAKTÖRLER

1- Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF'in, embriyogenez sırasında normal anjiyogenezde ve doğum sonrasında patolojik koşullarda retinanın anormal vaskülarizasyonunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Hipoksi bağımlı bir sitokin olup vasküler endotelyal hücre mitojenidir. VEGF geni oksijen basıncına duyarlıdır; hipoksi durumunda VEGF transkripsiyonu uyarılırken, hiperoksi durumunda ise genellikle VEGF transkripsiyonu azalmaktadır.¹⁰ VEGF, olgunlaşan avasküler retinada fizyolojik hipoksik dalgalara yanıt olarak astrositlerden ve mezenkimal iğsi hücrelerden salgınır.¹¹ Young ve ark., PR'li gözlerde avasküler retinada VEGF mRNA ekspresyonunun arttığını ve lazer sonrası ise azaldığını tespit etmiştir. Böylece VEGF'in PR patogenezinde rol oynadığını bildirilmiştir.¹²

Van Wijngarden ve ark.,¹³ OIR'e duyarlı (OIR-du) ve OIR'e dirençli (OIR-di) farelerde yaptıkları bir çalışmada; hiperoksik ortamda OIR-di farelerde normal anjiyogenezin olduğu ve VEGF ekspresyonunun oldukça arttığı, OIR-du farelerde ise anjiyogenezin yavaş olup, hipoksik ortamda ise OIR-du farelerde anormal vaskülarizasyon ile VEGF ekspresyonunun arttığı, OIR-di farelerde ise anjiyogenezin normal olduğunu tespit etmişlerdir. Anjiyogenez için VEGF'ün eşik bir seviyede olması gerektiği ve hiperoksik ortamda eşik altı VEGF'ün, hipoksik ortama geçişte proanjiyogenik faktörlerin salgınımı ile birlikte anormal retinal vaskülarizasyona neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

VEGF geni oldukça değişkendir, bilinen 70 den fazla polimorfik alleli mevcuttur. Fakat polimorfizimlerin çoğu ya nadir bulunmaktadır ya da fonksiyonel etkiye sahip değildir ve PR gelişiminde fonksiyonel polimorfizimlerin etkili olduğu bildirilmektedir.⁴ Farklı çalışmalarda tek nükleotid polimorfizimlerin (SNPs) protein salgınımında değişimlere neden olup, eşik hastalığa ilerleme riskinde artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Cooke ve ark. preterm bebeklerde yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada; VEGF geni 634. nükleotidinde G polimorfizmi taşıyan bebeklerin, eşik PR için bağımsız risk faktörü olduğunu göstermiş, ayrıca

G allel için homozigot olan bebeklerde eşik PR gelişme olasılığını iki kat fazla olduğunu bildirmişlerdir.¹⁴ Ancak Vannay ve ark. çalışmalarında; aynı gen için C allelinin yer almasını PR gelişme riskinin daha yüksek olduğunu, heterozigot bebeklerde iki kat, homozigotlarda üç kat fazla olduğunu ve bu allelin PR için bağımsız risk faktörü olduğunu belirtmiştir.¹⁵ Aynı gen için farklı sonuçlar çıkmasını, araştırmacılar VEGF G634C polimorfizminin 5' yan zincirindeki diğer polimorfizimlerle farklı bağlantılarının olabileceği ihtimaliyle ifade etmişlerdir.^{14,15} Kwinta ve ark., PR tedavisi gerektiren bebeklerde, VEGF-C460T polimorfizmini daha yüksek buldular.¹⁶ Ancak başka bir çalışmada, PR'li bebekler ile kontrol grubu arasında VEGF-G634C ile VEGF-C460T polimorfizimlerinde allelik açıdan fark yoktu.¹⁷ Ayrıca bu çalışmalarda, TT ve TC allel taşıyan bebeklerin PR açısından daha düşük bir riske sahip olduğunu tespit edilmiştir.¹⁶ Gismondi ve ark., preterm bebeklerde, VEGF geninin 3'-UTR polimorfizimleri (C702T, C936T, G1612A) ile PR arasında anlamlı ilişki olmadığını belirtmişlerdir.¹⁸

VEGF'ün fonksiyonel SNPs'lerinden VEGF-G405C'nin PR gelişiminde bir risk olduğu, VEGF-C2578A'nın ise risk oluşturmadığını bildirilmiştir.¹⁵ Bir grup preterm erkek bebekte bakılan VEGF-C2578A'nın şiddetli PR gelişenlerde daha az sıklıkta olduğu gösterilmiş ve bazı mutant allellerin varlığının VEGF üretimini azaltarak PR gelişimine karşı koruyucu olabileceği öne sürülmüştür.¹⁹ VEGF ile yapılan farklı çalışmalarda aynı SNPs için farklı sonuçlar çıkması; VEGF geninin lokalizasyonuna yakın başka genlerin (TNF α , Isı şok proteinleri, vb.) de retinopati ile ilişkilendirilip böylece PR gelişme riskinin yüksek tespit edildiği ve VEGF'de bağlantı analizinde diğer genlerin mutasyonlarının da buna dahil olabileceği ihtimaliyle açıklanmıştır.¹⁹

VEGF'in anormal anjiyogenezde rol oynadığının tespit edilmesinin anlaşılması üzerine PR tedavisinde anti-VEGF ajanlar kullanılmaya başlanmıştır. VEGF tarafından uyarılan MEF2C'nin (miyozit hızlandırıcı faktör), endotel hücrelerinde ekprese edildiği ve vaskülarizasyonda fonksiyonel rolü olduğu bildirilmektedir.²⁰ Endotel hücrelerinde spesifik MEF2C yok edilmiş OIR fare modellerinde vazooobliterasyon ve neovaskülarizasyonun olmadığı ve normal retinal anjiyogenezin olduğu gösterilmiştir.²¹

Aynı zamanda bu farelerde stres durumlarına karşı hücreleri koruyan HO-1 enziminde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Retina endotel hücrelerindeki MEF2C modülasyonunun gelecekte iskemik retinopati tedavisi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir.²² İn vivo olarak VEGF üretiminin kontrol edilmesinde rol oynayan Jun kinazların (JNK), transkripsiyon düzeyinde VEGF ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir.²³

Hücre kültür çalışmalarında JNK inhibitörlerinin VEGF mRNA'sını stabilize edici etkisi olduğunu saptanmış ve JNK'nın VEGF üretiminde ve anormal anjiyogeneziste kritik rol oynadığını tespit edilmiştir.²³ Ayrıca araştırmacılar, OIR fare modellerinde JNK eksikliğinin yada JNK inhibitörlerinin VEGF seviyesini düşürdüğünü ve patolojik anjiyogenezisi azalttığını saptamış ve JNK inhibisyonunun PR tedavisinde etkili bir yol olabileceğini öne sürmüştür.²⁴

2- Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörler-1 (HIF-1)

HIF-1, VEGF, anjiyopoetin 2, PIGF, eritropoetin gibi anjiyogenik faktörlerin salınımını doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen, hipoksi ile indüklenebilen transkripsiyon faktörlerindedir.²⁵ OIR hayvan modellerinde retina iskemik alanlarında HIF-1'in oldukça artmış olduğu tespit edilmiştir.²⁶ Özellikle HIF-1 α , proliferatif retinopatideki anormal vaskularizasyonda rol oynar.²⁷ Ayrıca HIF-1 α 'nın gen ekspresyonunun VEGF ile birlikte PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinden İNOS tarafından düzenlediği düşünülmektedir.²⁸ He ve ark. OIR de HIF-1 α 'nın diğer proanjiyogenik faktörlerle birlikte arttığını, iNOS inhibitörü sonrasında HIF-1 α seviyesinde azalma ve vazobliterasyonda gerileme olduğunu saptamıştır.²⁸ Dioum ve ark.,²⁷ OIR fare modellerinde yaptıkları bir çalışmada ise HIF-2 geni tek allelde fonksiyonel ve mevcut olan (haploinsufficient) farelerde normal HIF-2 α genine sahip olanlara göre retina neovaskularizasyonunun ve VEGF'in daha az olduğunu tespit etmiştir. Buna dayanarak HIF-2 α 'nın PR patogenezisinde rol oynadığını ve hem HIF-2 α hem de HIF-1 α 'ya yönelik yapılacak transfeksiyon çalışmalarının gelecekte PR tedavisinde kullanılabileceğini öne sürmüştür.

OIR hayvan modellerinde HIF-1'in doğrudan annexin (A2) ekspresyonunu aktifleştirdiği gösterilmiştir.²⁹ A2, hücre yüzeyinde bulunan fosfolipid bağlayıcı kompleks hücre reseptör proteindir. OIR farelerde yapılan bir çalışmada A2 olanlarda, olmayanlara göre 2.5 kat fazla neovaskularizasyon olduğu, ayrıca subretinal A2 verildiğinde fibrin tıkaçın ve retina anjiyogenezisin olduğu tespit edilmiştir. Huang ve ark.'na göre fibrin OIR de güçlü bir modulatördür ve fibrinolitik ajanların gelecekte PR tedavisinde kullanılabilecektir.²⁹

3- Pigment Epitelinden Türeyen Faktör (PEDF)

PEDF, retinal anjiyogeneziste nörotrofik faktör olarak bilinmektedir.³⁰ PEDF'in hem antiinflamatuvar ve hem de nöroprotektif özelliği de mevcuttur. PEDF, VEGF'in aksine hiperoksi bağımlı bir sitokin olup güçlü anjiyogenik inhibitördür. PEDF, VEGF'in VEGFR2'ye bağlanmasını engelleyerek VEGF ekspresyonunu azaltıp normal anjiyogenezisi etkilediği belirtilmektedir.³¹ Hem PEDF hem de VEGF fizyolojik ve patolojik anjiyogeneziste rol oynamaktadırlar.

Ayrıca bazı çalışmalarda artmış PEDF düzeyinin DRP ve SMD'de morbiditeyi azalttığı tespit edilmiştir.³² OIR farelerde yapılan farklı çalışmalarda PEDF ve PEDFR ekspresyonunun VEGF ile birlikte arttığı gösterilmiştir.³³ PEDF yok edilmiş transgenik farelerde hiperoksiyi takiben diğer farelere kıyasla daha geniş vazobliteratif alanların olduğu gözlenmiştir.³⁴ OIR farelerde dışarıdan verilen PEDF ile neovaskularizasyonda gerileme olduğu saptanmıştır.³⁵ OIR farelerde yapılan farklı çalışmalarda VEGF/PEDF oranının PR gelişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. VEGF/PEDF oranının <1 olması anjiyogeneziste azalmayı, oranın >1 olmasını ise anormal vaskularizasyonu gösterdiğini saptamışlardır.³⁶ Ancak hayvan modellerinde tespit edilen bu ilişki preterm bebeklerde gösterilememiştir.

Mintz-Hittner ve ark.,³⁷ PEDF'in hem nöroprotektif hem de anti inflamatuvar özelliklerinin olmasından dolayı anti-VEGF tedaviye alternatif olarak intravitreal PEDF formunun PR tedavisinde kullanılabileceği fikrini öne sürmüştür.

4- İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) ve IGF-1 Bağlayıcı Protein (IGFBP3)

IGF-1 gebeliğin tüm evrelerinde fetal büyüme ve gelişme için önemlidir. IGF-1 retina damarlarının normal gelişimi için gerekli olup eksikliği PR ile ilişkilendirilmektedir.³⁸ Oksijenden bağımsız IGF-1 hem VEGF aktivitesini artırarak tamamlayıcı etki hem de VEGF'den bağımsız olarak etki eden önemli bir faktördür. Serum IGF-1 seviyesi kilo alımı ve beslenme ile değişiklik gösterdiğinden haftalık ortalama değerlerin alınması daha uygun olduğu belirtilmektedir. PR gelişen bebeklerde ortalama serum IGF-1 seviyesinin PR gelişmeyenlere göre anlamlı olarak artmış olduğunu saptamış ve haftalık IGF-1'in ortalama serum seviyeleri klinik PR şiddeti ile doğru orantılı bulunmuştur.¹⁰ Perez ve ark.,⁴⁰ gestasyon haftasından bağımsız olarak, postpartum 3. haftada bakılan IGF-1 değerlerinin 30 ng/ml değerine eşit olması halinde, PR gelişimi %90 sensitivite ile öngörülebileceğini belirtmiştir.³⁹ Hem IGF-1 hem de IGF-1 reseptörlerinin çok sayıda farklı polimorfizimleri mevcuttur.⁴⁰ Balogh ve ark.,⁴¹ preterm bebeklerde IGF-1R'nin en sık görülen tek nükleotid polimorfizminden (SNP)'den IGF-1R G3174'ün PR gelişimi ile arasında bir ilişki olmadığını tespit etmişlerdir. JB1, IGF-1 analogu olup IGF-1R'nin yarışmalı antagonistidir. OIR farelerde başlangıçta kısa süreliğine verilen JB1'in neovaskularizasyonu engellendiği tespit edilmiştir.⁴¹ Araştırmacı, IGF-1 analogların gelecekte PR tedavisinde kullanılabileceğini ve daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği belirtmiştir.

IGF, plazmada IGFBP'ler aracılığıyla taşınır. Taşınmanın çoğu IGFBP3 ile olur. Bu molekül apoptozisi uyarıcı özelliğe sahiptir.

Ayrıca IGF'in fonksiyonlarını düzenleyerek anjiyogenezisi etkilediği düşünülmektedir. OIR hayvan modellerinde IGFBP3'ün farklı ekspresyonlarında retina damarlarının yeniden oluştuğu ve neovaskülarizasyonda gerileme olduğu tespit edilmiştir.⁴² PR olmayan bebeklerde haftalık IGFBP3 düzeyi PR saptananlara göre daha yüksektir.⁴³ Bundan dolayı IGFBP3'ün, PR gelişiminde koruyucu etkisi olabilir ve bu etki IGF'den bağımsızdır. Başka bir çalışmada, IGF-1/IGFBP3 oranının dengede tutulabilmesinin PR gelişimini engelleyebileceği ileri sürülmüştür.⁴²

5- Eritropoietin (EPO)

EPO anjiyogenezisi endotelin-1 salınımını artırarak uyarmaktadır. Oksijene bağımlı medyatör olan EPO, VEGF'ten bağımsız olarak anormal retina vaskülarizasyonda rol alır.⁴⁴ OIR hayvan modellerinde EPO azalmasının damar kaybı ile sonuçlandığı gösterilmiştir. EPO, PR'nin erken döneminde koruyucu etkiye sahipken, hipoksi fazında anormal vasülarizasyona neden olur.⁴⁵ Literatürde preterm bebeklerde serum EPO seviyesinde farklılıklar mevcuttur.^{46,47} Sato ve ark.,⁴⁷ evre 4 PR olan bebeklerden alınan vitreus örneklerinde, VEGF ve EPO düzeyini yüksek olarak saptamış ve bu durumun PR patogeneziinde rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Wang ve ark.,⁴⁸ OIR hayvan modellerinde periferik avasküler alandan JAK/STAT sinyal yolağının aktif olduğunu ve bu aktivasyonda STAT transkripsiyon faktörünün VEGF genini aktive ederken başka bir taraftan EPO geninin promotör bölgesine etki ederek azalttığını tespit etmiştir. Özellikle PR gelişiminin erken fazında anjiyogenik EPO'nin artırılmasına yönelik JAK/STAT sinyal yolağının hedef alındığı tedavi seçeneklerinin gelecekte PR tedavisi için iyi bir seçenek olabileceği belirtilmiştir.

6- Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

HGF, retina anjiyogenezisin başlangıcında düzenleyici rol oynar. HGF, endotel hücrelerinde VEGF ve VEGFR gibi anjiyogenik faktörlerin salınımını artırmaktadır. c-Met HGF reseptörüdür. HGF/c-Met sinyal ileti yolu, anjiyogenez üzerine VEGF/VEGFR ile birlikte sinerjik etki gösterir.⁴⁹ HGF/c-Met sinyal ileti yolu, anjiyogenez üzerindeki etkisinden dolayı anormal vaskülarizasyonu önleyici tedavi çalışmalarında hedef yolak haline gelmiştir.⁵⁰

7- Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

TNF α , inflamasyon ve apoptoziste rol oynayan major sitokinlerden biridir. OIR hayvan modellerinde, TNF α inhibitörlerinin fizyolojik anjiyogenezisi düzelttiği ve anormal vaskülarizasyonu azalttığı gösterilmiştir.⁵¹ Kociok ve ark.,⁵² TNF α reseptörlerinden TNF-Rp55'in yok edildiği (TNF-Rp55^{-/-}) transgenik OIR farelerde yaptıkları bir çalışmada; hem anormal vaskülarizasyonda hem de VEGF ekspresyonunda azalma tespit etmiştir.

TNF α 'nın proanjiyogenik ve VEGF'in TNF-Rp55'e bağlı bir yolakta eksprese edildiğini saptamıştır. Ayrıca PDGFB'nin TNF-Rp55^{-/-} olan farelerde on kat fazla eksprese olduğunu ve normal retinal anjiyogenez için PDGFB'nin gerekli olduğunu bildirmiştir. Moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasıyla gelecekte TNF α inhibitörlerinin neovasküler hastalıklarda kullanılabileceğini belirtmiştir.

PR GELİŞİM MEKANİZMASINDA ROL OYNAYAN BAŞLICA RESEPTÖRLER

1- Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörleri (VEGFR)

Endotel hücrelerinde VEGF'in etki edebilmesi için gerekli olan reseptörler (VEGFR) mevcuttur. Bu reseptörler FLT1 ve KDR genleri tarafından kodlanır. Bunlardan özellikle VEGFR-2'nin anjiyogeneziste rol oynar. Bu reseptör geninin bozuk yada eksik ekspresyonu anormal vaskülarizasyona neden olur.³¹ Budd ve ark.,⁵³ OIR farelerde özellikle intravitreal neovaskülarizasyonda VEGFR-2'nin VEGF ve semaforinler için reseptör görevi yapan nörofilinler (NPs) ile birlikte artmış olduğunu ve bunların anjiyogeneziste önemli rol oynadığını tespit etmiştir. Diğer reseptörlerden VEGFR-1'in ise VEGF'in VEGFR-2'ye bağlanmasını sınırlandırarak anjiyogeneziste düzenleyici rol oynadığı düşünülmektedir.⁵⁴ Ancak, Kwinta ve ark.,¹⁶ PR'li preterm bebeklerde serum VEGF ile VEGFR-1 düzeylerindeki farkın anlamsız olduğunu, PR gelişimi ile KDR gen polimorfizmi arasında anlamlı ilişki bulmadıklarını bildirmişlerdir.

İnsan endotel hücre yüzeyinde bulunan $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha v\beta 5$ integrinler PR'de aktive olmaktadır. $\alpha v\beta 3$ ve $\alpha v\beta 5$ integrinlerin peptid olmayan antagonisti SB-267268'in verildiği OIR farelerde VEGF ve VEGFR-2 ekspresyonunu engelleyerek anormal vaskülarizasyonu azalttığını tespit edilmiştir.³⁵ Özellikle VEGFR-2'ye yönelik yapılacak farmakolojik yaklaşımların PR tedavisinde alternatif tedavi olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca VEGF geninin C terminal ucundaki 8 ekzonluk değişim bölgesinde bulunan iki protein ailesinin her bir izoformunun VEGFR2 için yarışmalı agonist ve antagonist etki ettiği saptanmıştır.⁵⁵ İzoformların karşılıklı etkileşimlerin anlaşılması üzerine VEGF_{165b} izoformlarının PR tedavisinde kullanılabileceği gündeme gelmiştir.⁵⁶

Tirozin Kinaz Reseptörlerinden (Tie) Tie-1 ve Tie-2, endotel hücre yüzeyinde bulunan VEGFR tarafından eksprese edilen tirozin kinaz reseptörleridir. Özellikle Anjiyopietin (Ang) Tie-2'nin ligandı olup her ikisi anjiyogeneziste önemli rol oynar. Ang-1 Tie-2 üzerinde agonist, Ang-2 ise antagonist etki gösterir.⁵⁷ Ang-2 VEGF ile birlikte, Ang-1'in endotel hücrelerinde yaptığı migrasyon, çoğalma gibi etkileri engeller.

Hipoksi ile VEGFR tarafından ekspresyonu artan Ang-2 neovaskularizasyonda rol oynadığı gösterilmiştir.⁵⁸

2- Adenozin A Reseptörleri (AR)

AR, VEGF sinyal yolağında rol oynar. Retina anjiyogenezisini dolaylı olarak etkiler. Mino ve ark.,⁵⁹ OIR fare modelinde in vivo olarak A2BR antagonistin neovaskularizasyonu engellediği, ancak A2AR ve A1R antagonistlerin etkili olmadığını göstermiştir. Liu ve ark.,⁶⁰ transgenik OIR farelerde A2AR aktivasyonunun VEGF ekspresyonunu artırdığı, A2AR'leri yok edilmişlerde VEGF ekspresyonu olmadığını tespit etmiştir. Aynı çalışmada hem A2AR hem de A2BR antagonistlerinin OIR de anormal vaskularizasyonu seçici olarak engellediği de bulunmuştur. Gelecekte bu antagonistlerin PR tedavisinde farklı seçeneklerden biri olabileceği düşünülmektedir.

PR GELİŞİM MEKANİZMASINDA ROL OYNAYAN ENZİMLER

1- Endotelial Nitrik Oksit Sentetaz (eNOS) ve Arjinaz

Nitrik oksit (NO) vazoregulasyon, trombosit agregasyonu inhibisyonu gibi birçok fizyolojik olayda rol oynayan önemli bir moleküldür. eNOS endotel hücrelerinde hem anjiyogenezde, hem de vaskülogenezde önemli rol oynayan NO sentezleyen enzimlerin spesifik izoformudur. NO; VEGF, FGF ve matriks metalloproteinaz gibi birçok faktörün gen ekspresyonunu tetikler. eNOS ekspresyonu, eNOS geninde bulunan çok sayıda fonksiyonel polimorfizimden etkilenir. Farklı etnik kökenli PR gelişmiş bebeklerde bakılan eNOS genindeki T786C ile G894T polimorfizimlerin normal preterm bebeklere göre arttığı tespit edilmiştir. Ancak Rusai ve ark. PR gelişen ve tedavi gerektiren 105 bebekte eNOS 27-bp polimorfik tekrar bölgelerinin PR gelişmeyenlere göre farklı olduğunu, eNOS T786C açısından da farklılık olmadığını saptamışlardır.⁶¹ Brooks ve ark.,⁶² eNOS geninin yok edilmesi veya eNOS inhibitörü N^G-nitro-L-arjinin (L-NNA) kullanılması ile retina vaskularizasyonunda belirgin azalma ve retinopatide gerileme olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer bir çalışmada, Ando ve ark.,⁶³ eNOS geni yok edilmiş OIR hayvanlarda neovaskularizasyonda belirgin azalma tespit etmiştir. Özellikle eNOS aktivitesini önleyici tedavilerin gelecekte PR gelişimini engellemede etkili olabileceği düşünülmektedir.⁶²

Substratı L- arjinin olan iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentetaz), arjinin yokluğunda peroksinitrit oluşumuna yönelir. Arjinaz enziminin aktivitesi arttığında L- arjinin'in arjinaz tarafından yıkılır, böylece PR görülen nöron hasarının peroksinitrit ile oluştuğu belirtilmektedir.

Stone ve ark.,⁶⁴ proliferatif fazda astrosit dejenerasyonu olduğunu göstermiştir. Narayanan ve ark.,⁶⁵ arjinaz 2 geni modifiye edilmiş (Arj 2-/-) OIR fareler ile kontrol grubu (Arj 2+/+) OIR fareleri karşılaştırdıkları bir çalışmada; OIR farelerde görülen aksine arjinaz delesyonu olanlarda apoptozis ile glial aktivasyonda azalma olduğunu ve retina dejenerasyonu ile rod bipolar hücre kaybının olmadığını tespit etmiştir.

OIR'de artan gliyal dokunun neovaskularizasyonun için zemin oluşturduğu ve damarların vitreusa doğru ilerletilmesine neden olduğu düşünülmektedir.¹³ Böylece arjinaz 2'ye yönelik geliştirilecek tedavi seçeneklerinde PR de görülen nöro-gliyal hasarın önlenileceği fikri öne sürülmüştür.⁶⁵

2- Metalloproteinazlar (MMP)

Proteolitik enzim ailesinden olan MMP'lar proenzim olarak sentezlenir ve tPHA tarafından aktif forma dönüşürler. MMP- 2 ve MMP-9 selektif inhibitörlerinin intravitreal olarak verildiği OIR farelerde, retina neovaskularizasyonda gerileme olduğu tespit edilmiştir. Barnet ve ark.'nın yaptığı bu çalışmada metalloproteinazların retinal anjogeneziste kısmen rol oynadığını ve gelecekte PR tedavisinde MMP selektif inhibitörlerin tPHA inhibitörleri ile birlikte kombine kullanılabileceğini bildirmiştir.⁶⁶

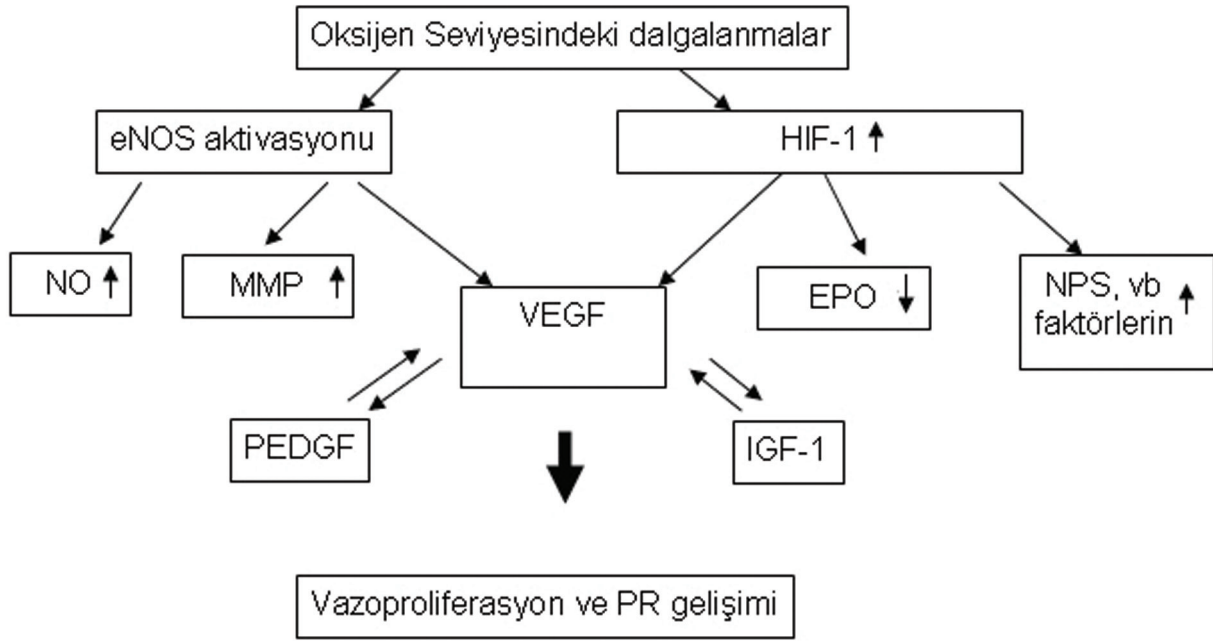
Matsui ve ark. MMP-2 ve MMP-9 geni yok edilmiş transgenik OIR fareler ile kontrol OIR farelerin karşılaştırdıkları bir çalışmada; özellikle MMP-2 olmayan grubun diğer gruplara göre ekstraretinal neovaskularizasyon az olduğunu tespit etmiştir.⁶⁸ Araştırmacı gelecekte MMP-2 inhibitörlerin oküler anjiyogenik hastalıklar açısından tedavi amacıyla kullanılabileceğini belirtmiştir.⁶⁸

PR BENZERİ GENETİK HASTALIKLAR VE WNT YOLAĞI

Norrie Hastalığı (ND) ve Ailevi Eksudatif Vitreoretinopati (FEVR)

ND ve FEVR prematür retinopati benzeri klinik bulgulara sahip gelişimsel retina hastalıklarıdır. ND; retinopati, sağırılık ve zeka geriliği ile karakterize X- bağlı kalıtsal bir hastalıktır.⁶⁷ ND gen mutasyonu, ND ve X-bağlı FEVR'in sebebi olarak gösterilmektedir. Bu gendeki mutasyon, norrin proteinin eksikliğine neden olmaktadır.

Norrin protein nöral farklılaşmada ve kan damarlarının şekillenmesinde rol oynar.⁶⁸ Norrin proteindeki eksiklik, retina anjiyogenezinde yetmezlik ve iskemi ile sonuçlanır.⁶⁹ ND'nin PR benzeri oküler klinik özelliklerinin olması nedeniyle, norrin proteinindeki bazı aminoasit değişimlerinin retinopati oluşumunda rol oynayabileceği ileri sürülmektedir.⁷⁰



Şekil: Prematür retinopati gelişiminde rol oynayan moleküllerin birbirleri ile etkileşimi.

FEVR avasküler iskemik alan, anormal vaskülarizasyon, dekolman ile seyreden PR benzeri kalıtsal bir retina hastalığıdır. Hastalığın patogenezinde, wingless/int 1 (wnt) reseptör sinyal yolağında bulunan FZD4 (frizzled 4), LRP5 (LDL reseptör ile ilişkili protein 5) ve ND genler ilişkilidir. (wnt) FZD4 Wnt reseptör ligandına bağlanarak, LRP5 de FZD4'e bağlanarak wnt sinyal yolağını aktive etmektedir.⁷¹ Bu genlerin bazı yanlış anlamalı mutasyonlarının aminoasit değişimlerine neden olup ağır PR patogenezinde rol oynadığı öne sürülmektedir.⁷²

Donald ve ark.,⁷² PR gelişmiş 20 preterm bebekten bir tanesinde FZD4 gen mutasyonu olduğu saptamış ve PR'nin genetik komponentinin multifaktöryel olduğu belirtmiştir. Hiraoka ve ark.,⁷⁰ ise 17 preterm bebekte yaptıkları çalışmada 1 bebekte ND ve bir bebekte de LRP5 gen mutasyonunu tespit etmiştir. Sharsty ve ark.,⁷³ ND genin 3. ekzonunda tanımladıkları iki mutasyonun PR gelişiminde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Haider ve ark.,⁷⁴ farklı evrelerde PR gelişen preterm bebeklerde ND genin (C597A) 3. ekzonunda önceden tespit edilen mutasyonlar dışında 4 farklı polimorfizm saptamışlardır.

Bugüne kadar mevcut tüm veriler göz önüne alındığında NDP, FZD4 ve LRP5 gen polimorfizimlerin PR'li bebeklerde yaklaşık %10-12 sıklığında saptandığını ve bu sıklığın etnik prevalansla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.⁷² Ayrıca araştırmacılar bu genlerin PR gelişiminde major bir risk faktörü olmadığını belirtmişlerdir.

Yukarıda belirtilen faktörlerin dışında OIR fare modellerinde MIP-1 α , MCP-1, IL-8 gibi proteinlerde is-

kemik retina alanlarından izole edilmiştir, bu proteinlerin de retina neovaskülarizasyonunda rol oynayabileceği belirtilmiştir.⁷⁵ Sato ve ark. da PR gelişmiş gözlerde proanjyonik faktörlerin dışında FGF, GM-CSF, G-CSF gibi inflamatuvar sitokinlerin de artmış olduğunu tespit etmişlerdir.⁴⁷

PR ile İlişki Gösterilemeyenler

OIR farelerde AQP-1 (akuaporin) ile yapılan bir çalışmada, retina damarlanmasının AQP-1'den bağımsız olduğu ve AQP-1 yokluğundan etkilenmediği gösterilmiştir.⁷⁶ Yıldız ve ark. da anjiyotensin konvertan enzim (ACE) I/D polimorfizmi ile glutatyon-S-transferaz (GST) enzim geninin GSTT1 ve GSTM1 polimorfizimleriyle PR gelişme riskinde korelasyon tespit etmediklerini bildirmişlerdir.⁷⁷

SONUÇ

PR gelişim mekanizmasında rol oynayan moleküllerdeki farklı mutasyon veya polimorfizimlerin çevresel faktörlerle birlikte hastalığa neden olduğu düşünülmektedir.

Oksijen seviyesinde oluşan dalgalanmalar PR gelişiminde rol oynayan moleküller üzerine önemli rol oynamaktadır. Özellikle hipoksi tarafından indüklenen HIF-1; VEGF, PEDGF, EPO, NPs gibi bir çok anjiyogenik faktörün ekspresyonunu etkilemektedir. Oluşan bu oksidatif stresten etkilenen diğer bir faktör de eNOS'tur. eNOS'un aktivasyondaki artış hem nitrotirozin gibi oksidan radikalleri oluşmasına hem de NO, VEGF ve MMP gen ekspresyonunun tetiklenmesine neden olmaktadır (Şekil).

Bu durum, PR gelişim mekanizmasında rol oynayan molekülerin çoğunun birbirleri ile ilişkili ve oldukça kompleks olduğunu göstermektedir. Bazı genlerdeki yanlış anlamlı mutasyonların aminoasit değişimine neden olup PR patogenezisinde rol oynadığı öne sürülmüştür. En sık ND ve FEVR gibi prematür retinopati benzeri klinik bulgulara sahip gelişimsel retina hastalıklarında tespit edilen ND, FZD4 ve LRP5 genler incelenmiştir. Ancak bu genlerin PR gelişiminde major bir risk faktörü olmadığı saptanmıştır. Penn ve ark., tarafından geliştirilen OIR hayvan modelleri PR patofizyolojisinin anlaşılmasına önemli katkı sağlamak ve sağlamaya devam etmektedir. Bu hayvan modellerinde PR tedavisine yönelik farklı moleküler çalışılmakta ve olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Günümüzdeki güncel tedavilere alternatif anti-VEGF tedavi de bunun sonuçlarındandır. PR'nin moleküler ve genetik temeli üzerine çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak tüm bu çalışmalara rağmen halen PR gelişim mekanizması hala anlaşılammış, PR gelişen bebeklerden hangisinin daha ağır seyredeceğini önceden belirtecek bir kanıt elde edilememiştir. PR hastalığına neden olan genetik predispozan faktörlerinin saptanması ve moleküler patofizyolojisinin anlaşılması ile yeni tedavi şekillerinin gelişimi sağlanırken aynı zaman da yüksek riskli gruplardaki bebeklere de erken müdahale ile tam görme kaybının önüne geçileceği umut edilmektedir.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Terry TL. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. I. Preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1942;25:203-4.
2. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 1991;98:1628-40.
3. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group: Results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial: revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2003;121:1684-96.
4. Csak K, Szabo V, Szabo A, et al. Pathogenesis and genetic basis for retinopathy of prematurity. *Front Biosci* 2006;11:908-20.
5. Dorta P, Kychenthal A, Treatment of type 1 retinopathy of prematurity with intravitreal bevacizumab. *Retina*. 2010;30:24-31.
6. van Wijngaarden P, Brereton HM, Coster DJ, et al. Hereditary influences in oxygen-induced retinopathy in the rat. *Doc Ophthalmol* 2010;120:87-97.
7. Askie LM, Henderson-Smart DJ, Irwig L, et al. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 2003;349:959-67.
8. Penn JS, Henry MM, Tolman BL. Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. *Pediatr Res* 1994;36:724-31.
9. Bizzaro MJ, Hussain N, Jonsson B, et al. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 2006;118:1858-63.
10. Chen J, Smith LE: Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007;10:133-40.
11. Chan-Ling T, Gock B, Stone J: The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1201-14.
12. Young TL, Anthony DC, Pierce E, et al. Histopathology and vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 1997;1:105-10.
13. van Wijngaarden P, Brereton HM, Gibbins IL, et al. Kinetics of strain-dependent differential gene expression in oxygen-induced retinopathy in the rat. *Exp Eye Res* 2007;85:508-17.
14. Cooke RW, Drury JA, Mountford R, et al. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1712-15.
15. Vannay A, Dunai G, Banyasz I, et al. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2005;57:396-8.
16. Kwinta P, Bik-Multanowski M, Mitkowska Z, et al. The clinical role of vascular endothelial growth factor (VEGF) system in the pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:1467-75.
17. Shastry BS, Qu X: Lack of association of the VEGF gene promoter (-634 G→C and -460 C→T) polymorphism and the risk of advanced retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:741-3.
18. Gismondi D, Ndoja L, Qu X, et al. Lack of association of VEGF gene 3'-UTR polymorphisms (C702T, C936T and G1612A) and the risk of developing advanced retinopathy of prematurity (ROP). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2013;251:413-5.
19. Banyasz I, Bokodi G, Vannay A, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and angiotensin 2 in retinopathy of prematurity. *Curr Eye Res* 2006;31:685-90.
20. Hosking BM, Wang SC, Chen SL, et al. SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:493-500.
21. Maiti D, Xu Z, Duh EJ. Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3640-8.
22. Xu Z, Gong J, Maiti D, et al. MEF2C ablation in endothelial cells reduces retinal vessel loss and suppresses pathologic retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Am J Pathol* 2012;180:2548-60.
23. Guma M, Rius J, Duong-Pol KX, et al. Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy through interference with VEGF expression. *PNAS* 2009;106:8760-5.
24. Pages G, Bera E, Milanini J, et al. Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem* 2000;275:26484-91.
25. Rey S, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. *Cardiovasc Res* 2010;86:236-42.
26. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:182-9.
27. Dioum EM, Clarke SL, Ding K, et al. HIF-2α haploinsufficient mice have blunted retinal neovascularization due to impaired expression of a proangiogenic gene battery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2714-20.
28. He T, Ai M, Zhao XH, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1α activation and vascular endothelial growth factor expression in oxygen-induced retinopathy. *Pathobiology* 2007;74:336-43.
29. Huang B, Deora AB, He KL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 drives annexin A2 system-mediated perivascular fibrin clearance in oxygen-induced retinopathy in mice. *Blood* 2011;118:2918-29.
30. Pieh C, Agostini H, Buschbeck C, et al. VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie2 levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2008;92:689-93.
31. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
32. Campochiaro PA, Nguyen QD, Shah SM, et al. Adenoviral vector-delivered pigment epithelium-derived factor for neovascular age-related macular degeneration: results of a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 2006;17:167-76.
33. Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001;489:270-6.

34. Huang Q, Wang S, Sorenson CM, et al. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Exp Eye Res* 2008;87:226-41.
35. Wilkinson-Berka JL, Jones D, Taylor G, et al. SB-267268, a non-peptidic antagonist of $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ Integrins, reduces angiogenesis and VEGF expression in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:1600-5.
36. Werdich XQ, McCollum GW, Rajaratnam VS, et al. Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 2004;79:623-30.
37. Mintz-Hittner HA, Kuffel RR. Jr. Intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or posterior zone II. *Retina*. 2008;28:831-838.
38. Smith LEH: Through the eyes of a child: understanding retinopathy through ROP the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5177-82.
39. Pérez-Muñuzuri A, Fernández-Lorenzo JR, Couce-Pico ML, et al. Serum levels of IGF1 are a useful predictor of retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 2010;99:519-25.
40. Balogh A, Derzbach L, Vannay A, et al. Lack of association between insulin-like growth factor I receptor G+3174A polymorphism and retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:1035-8.
41. Connor KM, Sangiovanni JP, Lofqvist C, et al. Increased dietary intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007;13:868-73.
42. Brock RS, Gebrekristos BH, Kuniyoshi KM, et al. Biomolecular effects of Jb1 (an IGF-I peptide analog) in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Pediatr Res* 2011;69:135-41.
43. Ning Y, Schuller AG, Bradshaw S, et al. Diminished growth and enhanced glucose metabolism in triple knockout mice containing mutations of insulin-like growth factor binding protein-3, -4, and -5. *Mol Endocrinol* 2006;20:2173-86.
44. Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, et al. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003;33:891-6.
45. Chen J, Connor KM, Aderman CM, et al. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 2008;118:526-33.
46. Bierer R, Peceny MC, Hartenberger CH, et al. Erythropoietin concentrations and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Pediatrics* 2006;118:635-40.
47. Sato T, Kusaka S, Shimojo H, et al. Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2009;116:1599-603.
48. Wang H, Byfield G, Jiang Y, et al. VEGF-mediated STAT3 activation inhibits retinal vascularization by down-regulating local erythropoietin expression. *Am J Pathol* 2012;180:1243-53.
49. Kaya M, Çokaklı M, Berk AT, et al. Associations of VEGF/VEGF-receptor and HGF/c-Met promoter polymorphisms with progression/regression of retinopathy of prematurity. *Curr Eye Res* 2013;38:137-42.
50. You WK, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep* 2008;41:833-9.
51. Gardiner TA, Gibson DS, de Gooyer TE, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 2005;166:637-44.
52. Kociok N, Radetzky S, Krohne TU, et al. Pathological but not physiological retinal neovascularization is altered in TNF-Rp55-receptor-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:5057-65.
53. Budd SJ, Hartnett ME: Increased angiogenic factors associated with peripheral avascular retina and intravitreal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2010;128:589-95.
54. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:469-748.
55. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004;64:7822-35.
56. Zhao M, Shi X, Liang J, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* 2011;93:921-6.
57. Davis S, Aldrich TH, Jone PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
58. Abdulmalek K, Ashur F, Ezer N, et al. Differential expression of Tie-2 receptors and angiopoietins in response to in vivo hypoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:582-90.
59. Mino RP, Spierri PE, Caballero S, et al. Adenosine receptor antagonists and retinal neovascularization in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3320-4.
60. Liu XL, Zhou R, Pan QQ, et al. Genetic Inactivation of the Adenosine A2A Receptor Attenuates Pathologic but Not Developmental Angiogenesis in the Mouse Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6625-32.
61. Rusai K, Vannay A, Szebeni B, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and 27-bp repeat gene polymorphisms in retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2008;14:286-90.
62. Brooks SE, Gu X, Samuel S, et al. Reduced Severity of Oxygen-Induced Retinopathy in eNOS-Deficient Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:222-8.
63. Ando A, Yang A, Mori K, et al. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cel Physiol* 2002;191:116-24.
64. Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, et al. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:290-9.
65. Narayanan SP, Suwanpradit J, Saul A, et al. Arginase 2 Deletion Reduces Neuro-Glial Injury and Improves Retinal Function in a Model of Retinopathy of Prematurity. *PLoS One* 2011;6:22460.
66. Barnett JM, McCollum GW, Fowler JA, et al. Pharmacologic and Genetic Manipulation of Matrix Metalloproteinases -2 and -9 Reduce Retinal Neovascularization in Rodent Models of Retinopathy of Prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:907-15.
67. Berger W. Molecular dissection of Norrie disease. *Acta Anat (Basel)* 1998;162:95-100.
68. Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, et al. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4 a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 2004;116:883-95.
69. Chen ZY, Battinelli EM, Fielder A, et al. A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet* 1993;5:180-3.
70. Hiraoka M, Takahashi H, Orimo H, et al. Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2010;16:2572-7.
71. Shastry BS, Hejtmanck JF, Trese MT. Identification of novel missense mutations in the Norrie disease gene associated with one X-linked and four sporadic cases of familial exudative vitreoretinopathy. *Hum Mutat* 1997;9:396-401.
72. MacDonald MLE, Goldberg YP, MacFarlane J, et al. Genetic variants of frizzled-4 gene in familial exudative vitreoretinopathy and advanced retinopathy of prematurity. *Clin Genet* 2005;67:363-6.
73. Shastry BS, Pendergast SD, Hartzler MK, et al. Identification of missense mutations in the Norrie disease gene associated with advanced retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1997;115:651-5.
74. Haider MZ, Devarajan LV, Al-Essa M, et al. C597-->A polymorphism in the Norrie disease gene is associated with advanced retinopathy of prematurity in premature Kuwaiti infants. *J Biomed Sci* 2002;9:365-70.
75. Ishikawa K, Yoshida S, Kadota K, et al. Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4307-19.
76. Ruiz-Ederra J and Verkman AS. Aquaporin-1-Independent microvessel proliferation in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4802-10.
77. Yildiz M, Karkucak M, Yakut T, et al. Lack of association of genetic polymorphisms of angiotensin-converting enzyme gene I/D and glutathione-S-transferase enzyme T1 and M1 with retinopathy of prematures. *Genet Mol Res* 2010;9:2131-9.