

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŐKANLIĐI

ÇÖZÜNEBİLİR VEGF RESEPTÖR-1'İN ANTİ-ANJİYOGENİK
ETKİNLİĞİNİN CİVCİV KORYOALLANTOİK MEMBRAN
MODELİNDE REAL-TİME PCR YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ

İbrahim AYDIN
Tbp. Kd. Ütğm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
Tıbbi Biyokimya Programı
İçin öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Taner ÖZGÜRTAŞ
Doç. Tbp. Kd. Alb.

Ankara
2010

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

“Çözünebilir VEGF Reseptör-1’in Anti-Anjiyogenik Etkinliğinin Cıvcıv Koryoallantoik Membran Modelinde Real-Time PCR Yöntemiyle Gösterilmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç.Tbp.Kd.Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ

Üye : Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M. Kemal ERBİL

Üye : Prof.Ecz Kd.Alb. Mustafa GÜLTEPE

Üye : Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. Cumhur BİLGİ

Üye (Yedek) : Doç.Dz.Tbp.Alb. Erdinç ÇAKIR

Üye (Yedek) : Doç.Dz.Tbp.Yb. Halil YAMAN

ONAY:

Tbp.Kd.Ütğm. İbrahim AYDIN’ın 06/07/2010 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR
Prof.Tbp.Tümgeneral
Komutan Bilimsel Yardımcısı,
As.Tıp.Fak.Dek. ve Eğt.Hst.Bştp.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığında yapılmıştır.

Bu çalışmada; anjiyogenez ve anjiyogenik süreç üzerinde çok önemli etkileri olduğunu düşündüğümüz sVEGFR-1'in, öncelikle makroskopik olarak, sonrasında ise moleküler tekniklerle, CAM modelinde anti-anjiyogenik etkinliğinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları bulunan ve her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M.Kemal ERBİL'e ve diğer hocalarım Prof.Ecz.Kd.Alb. Şerif AKMAN'a, Prof.Ecz.Kd.Alb. İsmail KURT'a, Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. Cumhur BİLGİ'ye, Doç.Dz.Tbp.Alb. Muhittin A. SERDAR'a, Doç.Dz.Tbp.Alb. Erdinç ÇAKIR'a, Doç.Dz.Tbp.Yb. Halil YAMAN'a, Doç.Dz.Tbp.Bnb. E. Özgür AKGÜL'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Kendimi yetiştirmem konusunda bana yol gösteren, bilimsel doğruları bulmak için eleştirel yaklaşım ve sorgulama yöntemlerinde bana rehberlik yapan, her zaman yakınlığını hissettiğim, tez danışmanım sayın hocam Doç.Tbp.Kd.Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım J.Tbp.Kd.Ütğm. F. Nuri AYDIN'a, Tbp.Kd.Ütğm. Mehmet AĞILLI'ya, J.Tbp.Kd.Ütğm. Erdim SERTOĞLU'na, Tbp.Kd.Ütğm. Emre İSPİR'e ve tüm laboratuvar personeline teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olarak bana destek olan, alabileceğim en güzel hediyem, sevgili eşim Nesibe AYDIN'a ve merakla beklediğimiz ailemizin yeni ferdi biricik oğlumuza teşekkür ederim.

Dr. İbrahim AYDIN
ANKARA-2010

ÖZET

Çözünebilir VEGF Reseptör-1'in Anti-Anjiyogenik Etkinliğinin Cıvıv Koryoallantoik Membran Modelinde Real-Time PCR Yöntemiyle Gösterilmesi

Sağlıklı organizmalarda anjiyogenez, anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasında oluşan bir dengeyle kontrol altında tutulur. Bu konsept, “anjiyogenik anahtar (angiogenic switch)” olarak adlandırılır. Bu faktörler arasındaki denge bozulduğunda, anjiyogenez kontrol edilemez ve patolojik anjiyogenez olarak adlandırılan süreç ortaya çıkar. Bu olay özellikle tümörlerin yayılmasında önemlidir. Anjiyogenez; inflamatuvar hastalıklar, kanser, diyabetik retinopati, psöriasis gibi, pekçok patolojik olayda önemli bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla anjiyogenik süreci tetikleyen veya inhibe eden tedavi yaklaşımlarının, bu tür hastalıkların seyrine önemli katkılar sağlayabileceği aşikârdır. Bu bakımdan, anjiyogenez çalışmaları, aktif bir araştırma alanıdır. Gelecek dekalarda anti-anjiyogenik veya proanjiyogenik tedavilerden fayda görecektir insan sayısının, tüm dünyada 500 milyonun üzerinde olacağı düşünülmektedir.

sVEGFR-1, ilk defa Shibuya ve ark. tarafından 1990 yılında tanımlanan, kanda ve vücut sıvılarında çözünmüş halde bulunan bir VEGF reseptörüdür. VEGF'e yüksek affinite ile bağlanmakta ve böylece VEGF'ün inhibisyonuna neden olmaktadır. Önceleri, sadece hamile kadınların vücut sıvılarında bulunduğu düşünülse de, cinsiyet farkı olmaksızın, sağlıklı insanların plazmasında da bulunduğu rapor edilmiştir. Ancak, organizmadaki fizyolojik rolü halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bizde bu çalışmamızda sVEGFR-1'in CAM modelinde anti-anjiyogenik etkinliğini, öncelikle makroskobik olarak, daha sonra RT-PCR yöntemiyle moleküler yönden, önemli bazı anjiyogenik faktör ve reseptörlerin ekspresyon düzeylerini nasıl etkilediğini saptamayı amaçladık.

Anahtar Kelimeler : CAM, sVEGFR-1, anti-anjiyogenik etki
Destekleyen Kurumlar : Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Yazar Adı : Tbp.Kd.Ütğm. İbrahim AYDIN
Danışman : Doç.Tbp.Kd.Alb. Taner ÖZGÜRTAŞ

SUMMARY

To Show of Anti-Angiogenic Efficiency of Soluble VEGF Receptor-1 In Chick Chorioallantoic Membrane Model with Real-Time PCR Method

In healthy organisms, angiogenesis is kept under control by a balance that created between angiogenic and anti-angiogenic factors. This concept is called as angiogenic switch. When the balance between these factors is impaired, the angiogenesis can not be controlled and the process that called as pathological angiogenesis occurs. This event is especially important in the spread of tumours. Angiogenesis has played an important role in many pathological events such as inflammatory diseases, cancer, diabetic retinopathy, psoriasis. Consequently, it is obvious that treatment approaches that trigger or inhibit the angiogenic process may provide important contributions to course of these diseases. In this regard, angiogenesis studies are an active area of research. The number of people in the world who will benefit from anti-angiogenic or proangiogenic treatments is thought to be over 500 million in the future decades.

sVEGFR-1, is a VEGF receptor that dissolved in the blood and body fluids in firstly defined by Shibuya et al. in 1990. It is binding with high affinity and thus leads to inhibition of VEGF. Although, that was considered to have been found only found in the body fluids of pregnant women previously, also found in the plasma of healthy humans without gender difference has been reported. However, the physiological role in organism has not fully understood. At first, in this study we aimed to determine anti-angiogenic effectiveness of sVEGFR-1 in CAM model as a macroscopically, subsequently how it affects expression levels of some important angiogenic factors and receptors by RT-PCR method for molecular aspects.

Keywords	: CAM, sVEGFR-1, anti-angiogenic affect
Supported by	: Gülhane Military Medical Academy
Author	: Dr. Ibrahim AYDIN
Counsellor	: Assistant Professor Taner OZGURTAS

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
2.1. Anjiyogenez Oluşum Mekanizması	5
2.1.1. Anjiyogenez Basamakları	6
2.1.1.1. Bazal Membranın Yıkımı	6
2.1.1.2. Endotel Hücre Göçü ve Proliferasyonu	7
2.1.1.3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması	7
2.2. Anjiyogenezde Etkili Faktörler	8
2.2.1. Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör-1	8
2.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	11
2.3. VEGF'ün Biyolojik Etkileri	15
2.4. VEGF Reseptörleri	16
2.4.1. VEGF Reseptör-1 (VEGFR-1)	16
2.4.2. VEGF Reseptör-2 (VEGFR-2)	17
2.4.3. VEGF Reseptör-3 (VEGFR-3)	18
2.4.4. VEGF Reseptör Uyarılması Sonrasında Hücrel Cevaplar	18
2.2.4.1. Proliferasyon	21
2.2.4.2. Migrasyon	21
2.2.4.3. Anti-Apoptotik Etki	22

2.2.4.4. Permeabilite Artışı	22
2.5. Anjiyogenezde Etkili Diğer Reseptörler	23
2.5.1. Nörofilin-1(NRP-1)	23
2.5.2. Çözünebilir VEGF Reseptörü-1 (sVEGFR-1)	24
2.5.3. Çözünebilir VEGF Reseptörü-2 (sVEGFR-2)	25
2.6. Anjiyogenez Modelleri	25
2.6.1. İn-vitro Modeller	26
2.6.2. İn-vivo Modeller	28
2.6.3. Cıvıv Koryoallantoik Membran (CAM) Modeli	29
2.7. Amaç	32
GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Çalışma Grubunun Deneye Hazırlanması	33
3.2. Gerekli Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeler	35
3.3. sVEGFR-1'in CAM'a Uygulanması	36
3.4. Çalışmanın Sonlandırılması	37
3.5. Rölatif Gen Ekspresyon Düzeylerinin Ölçümü	39
3.5.1. RNA İzolasyonu	39
3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	40
3.5.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Relatif Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Belirlenmesi	42
3.6. İstatistiksel Analizler	43
BULGULAR	44
TARTIŞMA	54
SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

BAD	: Bcl-2 associated death promoter
bFGF	: Bazik fibroblastik growth faktör
CAM	: Cıvcıv Koryoallantoik Membran
cDNA	: Komplementer DNA
CT	: Treshold Cycle
DAG	: Diaçilgliserol
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
Erk	: Extracellular signal-regulated kinase
ESM	: Ekstraselüler matriks
FAK	: Fokal Adezyon Kinaz
FIH-1	: HIF-1 inhibe edici faktör
Flk-1	: Fetal karaciğer kinazı-1
Flt1	: Fms-like tyrosine kinase-1
Flt4	: Fms-like tyrosine kinase-4
G6PDH	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GM-CSF	: Granülosit-monosit koloni stimüle edici faktör
HIF	: Hipoksiyle indüklenebilir faktör
HRE	: Hipoksi Responsiv Element
HUVEC	: Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	: İntraselüler adezyon molekülü-1
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IP-10	: İnterferon-gamanın indüklediği protein-10
KDR	: Kinase domain region
MMP	: Matriks metalloproteinaz
NRP-1	: Nörofilin-1
PA	: Plazmin aktivatörü
PAI-1	: Plasminojen aktivatör inhibitörü-I
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü

PHD	: Prolil hidroksilaz domain
PI3K	: Fosfatidilinozitol 3-kinaz
PIGF	: Plasental büyüme faktörü
PIP3	: Fosfatidilinozitol trifosfat
PKC	: Protein kinaz-C
PLC γ	: Fosfolipaz C-gama
PPRP	: Plasental proliferin ilişkili protein
pVHL	: Von-Hippel-Lindau proteini
sVEGFR-1	: Soluble VEGF Reseptör-1
svVEGF	: Snake-venom VEGF
TAF	: Tümör Anjiyogenezis Faktör
TGF α	: Transforme edici büyüme faktörü-alfa
TIMP	: Doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri
TNF α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
TSAd	: T-Hücre spesifik adaptör protein
uPA	: Ürokinaz-Plazminojen Aktivatörü
UPL	: Universal Probe Library
VCAM-1	: Vasküler sellüler adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
VEGFR	: VEGF Reseptörü
VRAP	: VEGF Reseptör ilişkili protein

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. HIF aktivasyonunun Oksijen varlığında ve Hipoksik koşullarda düzenlenmesi	10
2.2. VEGF mRNA'sından alternatif-splicing ile oluşan VEGF izoformları	12
2.3. VEGFR-2'nin moleküler yapısı.	20
2.4. Hücre içi VEGF etki mekanizmaları.	23
2.5. Döllenmiş yumurta, embryo ve zarların şematik gösterimi.	31
3.1. Karanlık odada ışık kaynağı yardımıyla civciv embryosunun yerinin tespit edilmesi.	33
3.2. İnkübasyonun 5. gününde yumurtalara uygulama yapmak üzere uygun bölgeden kabuğun kırılarak pencere açılması.	34
3.3. CAM üzerinde damarlanmanın artarak devam ettiği uygun bölgeye, distile su içerisinde etken maddenin uygulanması ve parafilm yardımıyla yumurtaların kapatılması.	37
3.4. Çalışmanın sonlandırılma aşamasında, uygulama yapılan bölgeden CAM örneklerinin alınması.	38
4.1. Uygulama öncesi ve sonrasında makroskopik değerlendirme örnekleri	45
4.2. RT-PCR çalışmasında amplifikasyon siklusları esnasında, floresans piki ile farklı genlerin CT değerlerinin belirlenmesi.	47
4.3. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-1 mRNA ekspresyon düzeyleri	49
4.4. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-2 mRNA ekspresyon düzeyleri	50
4.5. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-3 mRNA ekspresyon düzeyleri	51
4.6. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGF-A mRNA ekspresyon düzeyleri	52

4.7.	RT-PCR çalışması yapılan gruplarda HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeyleri	53
------	---	----

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
1.1. Başlıca Proanjyogenik ve Anti-anjyogenik Faktörler	4
2.1. VEGF Ailesi Üyelerinin Karşılaştırması	15
4.1. Makroskopik değerlendirme sonrası gruplara göre uygulama etkinlik dereceleri	44
4.2. Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırma sonuçları	46
4.3. Rölatif gen ekspresyon düzeyleri	48

1. GİRİŞ

Organizmada, yeni damar oluşumu iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir: Anjiyogenez ve Vaskülogenez. Endotel hücrelerinin, mitoz bölünme ile çoğalarak ve göç ederek, var olan damarlardan filizlenme şeklinde yeni kapiller yapılar oluşturmaya, anjiyogenez denir. Vaskülogenez ise, intrauterin dönemde, dolaşımda bulunan mezoderm kökenli endotel hücre öncüllerinin (endotelyal progenitör hücreler veya anjiyoblastlar olarak adlandırılır), olgun endotel hücrelere dönüşmesi ve yeni bir vasküler yapı oluşturmaya olarak bilinir. Her iki mekanizma da, yaşam boyunca organizmada dolaşım sisteminin gelişmesi ve sürekliliğini koruması için gerekli olan süreçlerdir.

Yakın tarihlere kadar, yetişkin bireylerde, iskemik dokuların oksijen ve besin ihtiyacının karşılanmasında, sadece anjiyogenez mekanizmasının aktif olarak görev aldığı; vaskülogenezin ise sadece embriyonik dönemle kısıtlı olduğu düşünülmekteydi. Ancak, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, doğum sonrası dönemde de, kemik iliği kaynaklı hematopoetik progenitör hücrelerin, endotel hücresine dönüşebildiği, iskemik hasar sonrasında endotel bütünlüğünün tekrar oluşmasında rol aldıkları ve vaskülogenezin devam ettiği yönünde bulgulara ulaşılmıştır (1,2).

Anjiyogenez, yetişkin bireylerde yara iyileşmesi, menstrüel siklus gibi fizyolojik olaylarda veya inflamatuvar hastalıklar, kanser, diyabetik retinopati, psöriasis gibi, pekçok patolojik olayda, önemli bir rol oynamaktadır (3). Bu bakımdan, anjiyogenez çalışmaları, aktif bir araştırma alanıdır. Gelecek dekalarda anti-anjiyogenik veya proanjiyogenik tedavilerden fayda görecektir insan sayısının, tüm dünyada 500 milyonun üzerinde olacağı düşünülmektedir (4).

Anjiyogenez kavramının tarihçesine baktığımızda, bu konudaki ilk çalışmalar oldukça eski tarihlerde yapılmasına rağmen, yazılı literatürde ilk bulgulara yaklaşık yüz yıl kadar önce rastlamaktayız. Yeni damar oluşumu ilk defa 1935 yılında, Hertig'in yaptığı çalışmada anjiyogenez (angiogenesis) olarak adlandırılmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda, tümör kitlesi içerisinde yeni damar gelişimlerinden bahsedilmiş, ancak tümör hiperemisi olarak adlandırılan bu

durumun, tümör metabolitlerinin neden olduğu vazodilatasyona bağlı olarak oluştuğu düşünülmüştür (6). Yine aynı dönemlerde yapılan çalışmalarla, tümörün mevcut damarlarla mı beslendiği, anjiyogenez ile yeni damarlar mı oluşturduğu sorusu, uzun süre araştırılmıştır. Algire ve ark. yaptıkları bir çalışmada, tümör implantındaki yeni damarların, konakçı damarlarından köken aldığını rapor etmişlerdir (7). Ide ve ark. ise, doku harabiyeti sonucunda oluşan anjiyogenezin bir süre sonra durduğu ve gerilediğini, buna karşın canlı deneklere implante edilen tümörlerde, anjiyogenezin artarak devam ettiğini göstermişlerdir (8). Anjiyogenez, 1971 yılında Folkman'ın açıkladığı sistematik yaklaşımla, bilim dünyasında popüler bir konu haline gelmiştir (9). Folkman "tümör gelişimi anjiyogeneze bağımlıdır" teorisi ile şu görüşleri ileri sürmüştür:

- 1- Tümörler 1-2 mm çapa ulaşana kadar avasküler bir evrede, pasif difüzyon ile beslenerek yaşamını devam ettirir. Bu avasküler evrede tümörler maksimum 1-2 mm çapa ulaşabilirler.
- 2- Bu tümör kitlesi, konakçı damarlarından kendisine besin ve oksijen gibi temel gereksinimleri karşılayacak yeni kapiller damarlanmayı, yani anjiyogenezisi başlatabilir. Böylece büyüme ve metastaz yapma imkânı bulur.
- 3- Tümör hücrelerinden salgılanan ve o gün için "Tümör Anjiyogenezis Faktör (TAF)" adı verilen bir büyüme faktörünün, Anjiyogeneze sebep olduğu düşüncesi ileri sürülmüştür.
- 4- TAF yapımını ya da onun biyolojik fonksiyonunu önleyerek veya bu döngüde görev alan hücresel elemanların hedef alınmasıyla, tümör anjiyogenezisi ve tümör büyümesini bloke etmek mümkün olabilir.
- 5- Bu tür tedavi yaklaşımları başarılı olursa, tümör hücreleri eradike edilemese bile; tümörün ilerlemesi engellenebilir veya belki de tümörün avasküler dönemdeki, 1-2 mm'lik boyutlara gerilemesi sağlanabilir.

Bundan sonraki yıllarda, anjiyogenezin oluşum mekanizması, anjiyogenez ile ilgili parametrelerin ölçümü ve moleküler düzeyde hangi olayların anjiyogeneze nasıl katkı sağladığı konuları, daha yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Folkman'ın bu

tezini açıklamasından sonra, kısa sürede, tümör gelişiminin anjiyogeneze bağımlı olduğuna dair pek çok delil toplanmıştır. Bilim çevrelerinde, anjiyogeneze inhibe edilirse, tümörün ilerlemesinin duracağı hatta gerileyeceği düşüncesi kabul görmüştür (10,11).

Bu gelişmelerle birlikte anjiyogeneze alanındaki çalışmalar hız kazanmıştır. Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF) ve diğer bazı anjiyogenik faktörlerin endotel hücrelerindeki etkilerinin gösterilmesi, tümör metastazlarında olduğu gibi anjiyogeneze sürecinde de, vasküler bazal membranın yıkılmasına ihtiyaç olduğunun anlaşılması (12-14), bu konudaki önemli gelişmelerdendir. Bu dönemde; endotel hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen ve anjiyogenezi durduran (anjiyostatik) veya stimüle eden (anjiyogenik) bazı faktörler tanımlanmıştır (15-20). Bu faktörler içerisinde, VEGF, asidik ve bazik Fibroblast Growth Faktör (FGF), öne çıkan anjiyogenik faktörlerdir (21,22). Diğer başlıca anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler tablo 1.1’de görülmektedir (21-27).

Bu çalışmada rekombinant insan soluble VEGF Reseptör-1’in (sVEGFR-1), Cıvıv Koryoallantoik Membran (CAM) modelinde anti-anjiyogenik etkinliğinin, öncelikle makroskopik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Daha sonra bu modelden elde edilen örneklerde, anjiyogenezin başlıca uyarıcıları olan HIF-1 α ve VEGF’e ait reseptörlerin, kontrol grubunda ve sVEGFR-1 uygulanan gruplardaki ekspresyonlarının karşılaştırılması ve bu parametrelere ait ölçüm yöntemlerinin GATA Tıbbi Biyokimya AD. laboratuvarlarında kurulması amaçlanmıştır.

Tablo 1.1. Başlıca Proanjiyogenik ve Anti-anjiyogenik Faktörler

Proanjiyogenik Faktörler	Anti-Anjiyogenik Faktörler
VEGF	Anjiostatin
EGF	Angioarrestin
FGF 1,2,5	Trombosit faktörü IV
GM-CSF	IP-10
HGF/SF	Hyaluronan
Hyaluronan oligosakkaritler	IL-12
Hipoksi	İnterferonlar
IL-3-8	MMP ve PA inhibitörleri
PDGF	16 kDa prolaktin fragmanları
PIGF	Proliferin ilişkili protein
Proliferin	Steroid metabolitleri
Prostaglandinler	Glukokortikoidler
TGF- α ve β	Retinoidler
Doku Faktörü	Ribonükleaz inhibitörleri
TNF α	Trombospondin-1
IGF-1	TIMP-1,2,3
Angiogenin	Endostatin
Angiopoietin-1	Prolaktin
İntegrin $\alpha 5 \beta 3$ - $\alpha 5 \beta 5$	PPRP (Plasental proliferin related protein)
Adrenomedullin	C-X-C kemokinleri
Leptin	Canstatin
Midkine	Fibronektin fragmanları
Pleiotrophine	Heparinaz
Thymosine $\beta 4$	İnterferon İnducible Protein
Progranulin	Tumstatin
Follistatin	Thalidomide

2. GENEL BİLGİLER

Anjiyogenez, fizyolojik ve patolojik anjiyogenez olmak üzere iki başlık altında incelenir. Fizyolojik anjiyogenez intrauterin dönemde fetüste başlar ve bu dönemde, doğum sonrası hayata oranla daha aktiftir. Postnatal dönemde ise, menstrüasyon, yara iyileşmesi gibi birkaç fizyolojik olayda rol üstlenir. Bunların dışında, sağlıklı erişkinlerde anjiyogenez oldukça kısıtlanmıştır (28). Sağlıklı organizmalarda anjiyogenez, endotel hücrelerinin bölünerek çoğalmasını ve etkinleşmesini sağlayan anjiyogenik faktörler ile bu etkileri dengeleyen anti-anjiyogenik faktörler arasında oluşan bir denge ile kontrol altında tutulur (29). Bu konsept, “anjiyogenik anahtar (angiogenic switch)” olarak adlandırılır (30). Bu faktörler arasındaki denge bozulduğunda, anjiyogenez kontrol edilemez ve patolojik anjiyogenez olarak adlandırılan süreç ortaya çıkar. Bu olay özellikle tümörlerin yayılmasında önemlidir. Anjiyogenez ayrıca iskemik kardiyovasküler hastalıklar, retinopatiler ve inflamasyonla birlikte seyreden pek çok patolojik durumda, kritik öneme sahiptir (31,32).

Fizyolojik anjiyogenez kendi kendini sınırlayan bir olay olup genellikle birkaç haftada sonlanırken, patolojik anjiyogenez, aylar hatta yıllar boyu devam edebilmektedir (33). Fizyolojik anjiyogenezde damarlar, düzenli bir şekilde dallanırlar ve iyi düzenlenmiş bir dağılım gösterirler. Patolojik anjiyogenezde ise, yeni oluşan vasküler yapılar son derece anormal ve düzensizdirler. Dallanmaları belirli bir hiyerarşiye uymaz. Yüzeylerinde, normal vasküler yapılara oranla, büyüme faktörlerine ait reseptörler daha fazla miktarda bulunmaktadır. Ayrıca yapısal ve işlevsel açıdan heterojen olup, plazma proteinlerine ve plazmaya karşı, genellikle yüksek derecede geçirgendirler (31,34).

2.1. Anjiyogenez Oluşum Mekanizması

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Bu süreçte, hücreler arası matriks, bu matriksi çevreleyen hücreler, bu hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, pek çok sitokin ve bunların reseptörleri rol oynar (34-36).

2.1.1.Anjiyogenez Basamakları;

Herhangi bir dokuda, hipoksik uyarıyı takibeden dönemde, anjiyogenez şu basamakları takibederek oluşur:

- Hipoksik uyarı sonrasında anjiyogenik faktörlerin salınması
- Bu faktörlerin mevcut damarların endotel hücrelerini aktive etmesi
- Aktive endotel hücrelerinden proteazların salınması
- Varolan damar ağının çevreleyen bazal membranın harabiyeti
- Endotel hücrelerinin intersitisyel alana migrasyonu
- Endotel hücre proliferasyonu
- Lümen formasyonu oluşması
- Perisitlerin yardımıyla yeni bazal membranın oluşturulması
- Yeni oluşan damarların füzyonu
- Kan akışının tekrar başlaması (37).

2.1.1.1.Bazal Membranın Yıkımı

Yeni kapiller yapıların oluşabilmesi için, mevcut damarların bazal membranının yıkılması ve endotel hücrelerinin, anjiyogenezin gerçekleşeceği dokuya doğru ilerlemesi gerekmektedir (38-40). Normalde, endotel hücreleri tek bir tabaka halinde bulunan, bölünme ve çoğalma eğilimi göstermeyen hücrelerdir. Ancak anjiyogenez sırasında bölünür ve anjiyogenik uyarının kaynağına doğru yayılım gösterirler.

Hipoksik dokulardan tepki olarak üretilip salgılanan anjiyogenik faktörler, komşu dokulara difüzyon yolu ile geçer. Bu anjiyogenik faktörler, salgılandıkları dokuların yakınındaki, mevcut kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere bağlanırlar. Anjiyogenik faktörler tarafından aktive edilen proteolitik enzimler, bazal membranın ve endotel hücrelerini döşeyen ekstraselüler matriks (ESM) bileşenlerinin yıkımına neden olurlar.

Anjiyogenez süreci, öncelikli olarak, damar endotelini döşeyen bazal membranın proteolitik yıkımı ile başlar (41). Bu işlemde, plazmin aktivatörü (PA) ve matriks metaloproteinazları (MMP) birlikte görev alırlar (38,40). Plazmin

aktivatör'leri plazminojeni plazmine çeviren proteazlardır. Doku düzeyinde fibrinolitik aktivite ürokinaz-Plazminojen Aktivatörü (uPA) tarafından düzenlenir. Plazmin, ekstrasellüler matriksde (ESM) bulunan fibrin, fibronektin, laminin ve proteoglikanlar gibi birçok molekülü parçalar. Ayrıca pekçok MMP enzimini aktive eder (38). MMP ailesinin doğada bilinen 28 civarında üyesi vardır. Bunlardan 18 tanesinin insanlarda sentezlendiği düşünülmektedir. Bu enzimler yapılarına ve ürün duyarlılıklarına göre sınıflandırılırlar. Birçok kanser türünde, MMP aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (38,42). MMP enzimleri, başlıca MMP-2 ve MMP-9 olmak üzere, anjiyogenezde bazal membranın temel kollajen bileşimi olan tip IV kollajenin ve ESM'in yıkımında görev alırlar. ESM'in ve bazal membranın enzimatik yıkılımı aşamasını, endotel hücrelerinin uyarılması ve kapiller filizlenme takip eder (43).

2.1.1.2.Endotel Hücre Göçü ve Proliferasyonu

Bazal membranın yıkılması endotel hücre göçüne ve yeni kapiller filiz oluşumuna izin verir. ESM ve bazal membranın proteolitik yıkımından sonra, endotel hücreleri bu bölgeden göç etmeye başlarlar. Bu olay "Endotel hücre migrasyonu" olarak adlandırılır. Daha sonra, bu göç eden endotel hücreleri yeni vasküler yapıların oluşacağı alanda bölünerek, sayıca çoğalmaya başlarlar. Bu olay ESM'den salınan birçok anjiyogenik faktör tarafından uyarılır. Bu süreçte etkili anjiyogenik faktör, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür (32).

2.1.1.3. Kapiller Oluşumu ve Damar Olgunlaşması

Endotel hücrelerinin, yeni kapiller yapılar oluşturmak üzere birbirlerine tutunabilmesi ve organize olabilmeleri için, ESM'in proteolitik yıkımının, lokal olarak inhibe edilmesi ve ESM bileşenlerinin bu alanda birikmesi gerekmektedir. Bu aşamada MMP ve kollajenazların inhibisyonunda, doku matriks metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP) düzenleyici rol oynarlar (44). Ancak yeni oluşan kapiller filizlenmenin uç tarafındaki ESM'de, proteolitik yıkılma devam eder ve bu sayede yeni oluşan kapiller filizin uzaması mümkün olur. Endotel hücrelerinin birbirine tutunmaları ve uzaması sırasında, hücre içi ve hücreler arası boşlukta, sonunda

kendilerinden damarların oluştuğu lümenler gelişir. Bu tutunma ve lümen formasyonu gelişiminde, integrinler, laminin ve adezyon molekülleri aktif rol oynarlar (45). Bu şekilde, ESM proteolitik yıkımının, birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda, yeni filizlenen vasküler yapıların boyları uzar. Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler, yeni bazal membranı oluştururlar. Anjiyogenik stimulusla yeni oluşan damarlar ve bunu izleyen olgunlaşma sürecinden sonra anjiyogenik faktörlerde azalma buna karşın anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Böylece anjiyogenik süreç sonrası oluşturulmuş yeni damarlarda kan akımı başlar (46).

2.2. Anjiyogeneizde Etkili Faktörler

2.2.1. Hipoksiyle İndüklenebilir Faktör-1

Anjiyogenik faktörlerin sentez ve salınımları, düşük serum glukoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda artmaktadır. Bu faktörler arasında, VEGF sentezini, en yüksek oranda hipoksinin artırdığı bilinmektedir (47).

Hipoksiye karşı hücre sel cevapta, hipoksi inducible transkripsiyon faktör (HIF)'leri olarak adlandırılan faktörler (HIF-1 ve izoformları), hücre içi sinyal iletimi ve gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev almaktadır. HIF, hücrenin hipoksiye maruz kaldığı durumda, enerji metabolizması, eritropoez, hücre proliferasyonu ve apoptozis ile ilgili yaklaşık yüz civarında genin ekspresyonunu düzenler. Bununla birlikte, HIF'lerin hücre içi seviyelerinin artması, proanjiyogenik faktörlerin de upregülasyonuna neden olur. Böylece yeni damarlar oluşur ve hücrelerin ihtiyaçı olan oksijen ve diğ er maddelerin karşılanması sağlanır.

HIF izoformlarından HIF-1, organizmada tüm hücreler tarafından sentezlenebilmektedir. HIF-1, birçok fizyolojik ve patolojik olayda oksijen homeostazisinin temel düzenleyicisidir (48). Hoebe n ve ark. yaptıkları bir çalışmada HIF-1'in, DNA üzerinde VEGF-A sentezinden sorumlu gen bölgesine bağlanmasıyla VEGF sentezinin uyarıldığını rapor etmişlerdir (49). Yine bu konuda yapılan başka bir çalışmada, HIF-1α'nın, VEGF-A gen promotor bölgesindeki

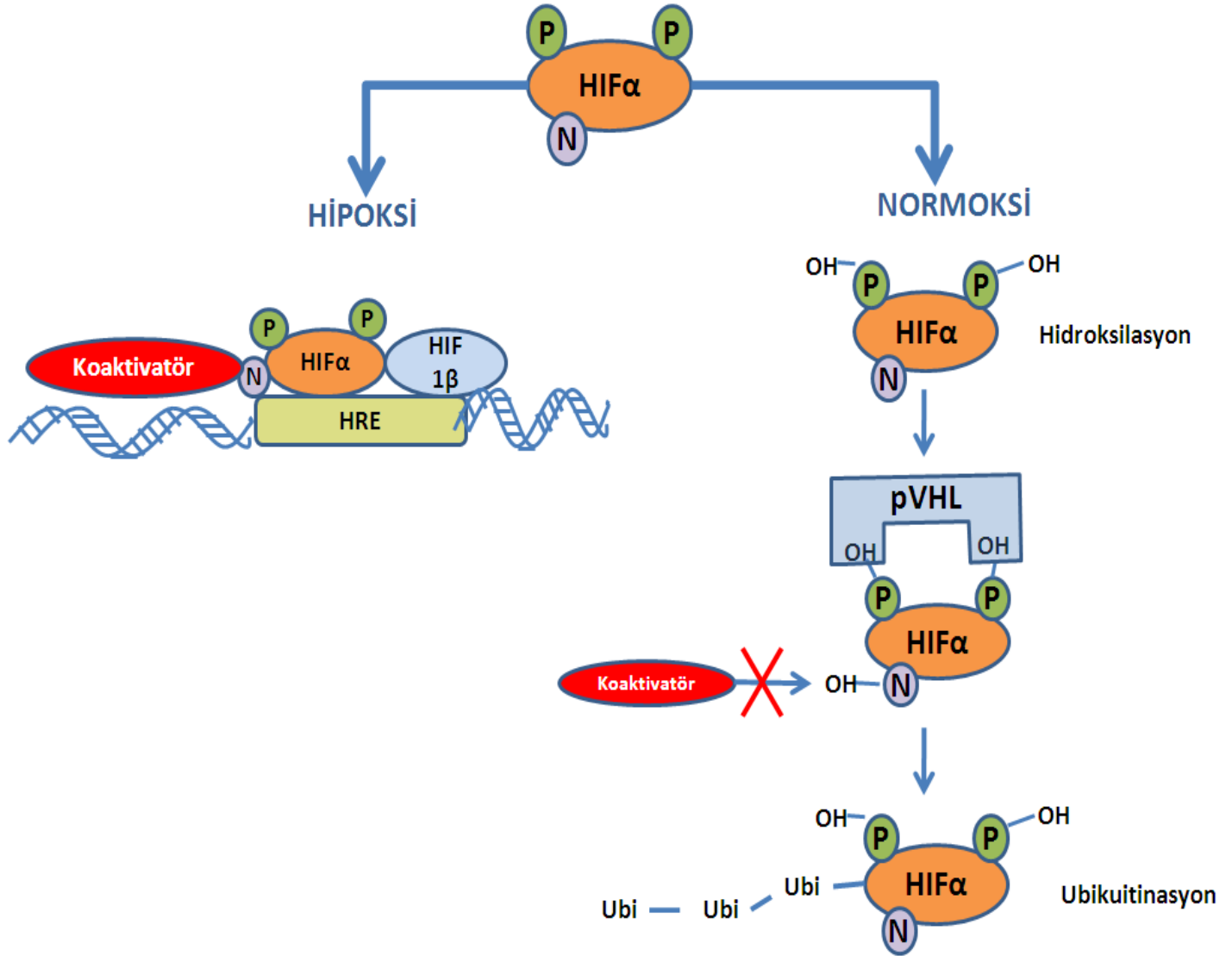
Hipoksi Responsiv Element (HRE) bağlanarak, VEGF-A'nın transkripsiyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (50,51).

HIF-1 iki alt birimden oluşan (HIF-1 α ve HIF-1 β) heterodimerik bir moleküldür. Her altbirimin amino-terminali, heterodimerizasyon ve DNA bağlanmasına aracılık eder. HIF-1 β sürekli olarak eksprese edilirken, HIF- 1 α seviyeleri, hücre içi oksijen konsantrasyonu ile düzenlenir.

Hücre içi oksijen seviyeleri normalken, HIF- 1 α prolil hidroksilaz domain olarak adlandırılan enzim (PHD) aracılığıyla özgün bir prolil hidroksilasyonuna uğrar. Hidroksillenmiş HIF- 1 α , von Hippel-Lindau proteininin bağlanmasına uygun moleküler yapıdadır. Ortamda oksijen varlığı, aynı zamanda, HIF- 1 α domaininin, asparaginil rezidüsünün hidroksilasyonu ile HIF-1 α 'nın transripsiyonel koaktivatörlerle etkileşimini de engeller, bu olay HIF-1 inhibe edici faktör (FIH-1) olarak adlandırılan oksijen bağımlı asparaginil hidroksilaz tarafından düzenlenir. Böylece, normoksi durumunda HIF- 1 α , prolil ve asparaginil hidroksilasyonu ile modifiye edilerek, kararsız ve inaktif hale getirilir (52).

HIF-1 α 'nın hidroksillenmesi, bu molekülü Von-Hippel-Lindau proteininin (pVHL) hedefi haline getirir. von Hippel-Lindau (VHL) geni 3p25-26'da yer almaktadır. Bu genin ürünü olan pVHL, farklı hücre içi oksijen seviyelerinde, hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (53). Hücre içi oksijen seviyesinin normal olduğu durumlarda pVHL, ubiquitin ligaz enziminin substrat tanıma kısmı olarak fonksiyon görür. Böylece, hidroksillenmiş HIF molekülü, ubiquitinasyondan sonra, proteozomlarda yıkıma uğrar (54,55).

Hücre hipoksi durumunda ise, HIF'lerin hidroksilasyonunu düzenleyen PHD ve FIH enzimleri inaktif durumdadır. Bu nedenle HIF-1 α hidroksilenmemiştir ve pVHL ile etkileşim gerçekleşemez. Dolayısıyla HIF'ler hücre içinde birikir. Hücre içinde HIF seviyelerinin artması sonucunda bu artış hücre çekirdeğine de yansır. Proteozomal yıkıma uğramayan HIF- α stabilize olur ve nükleus içinde HIF- β ile birleşerek aktif HIF'i oluşturur (49,51). Sonuçta HIF, DNA üzerinde hipoksi ile tetiklenen çok sayıda gen bölgesi için, transkripsiyonel düzenleyici olarak işlev görmektedir (56-58).



Şekil 2.1. HIF aktivasyonunun Oksijen varlığında ve Hipoksik koşullarda düzenlenmesi

HIF-1 hücrel hipoksinin yanında, aynı zamanda sitokinler ve interlökin-1beta (IL-1 β), tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi büyüme faktörleri tarafından da aktive edilebilir (59).

2.2.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, tüm vasküler yapılarda ve lenfatik damarların yapısında bulunan endotel hücreleri için potent bir mitojendir. Ancak, diğer hücreler üzerinde bu şekilde bir mitojenik aktivitesi yoktur. Endotel hücrelerine yönelik bu etkisinin vurgulanması amacıyla, VEGF şeklinde adlandırılması önerilmiştir (60).

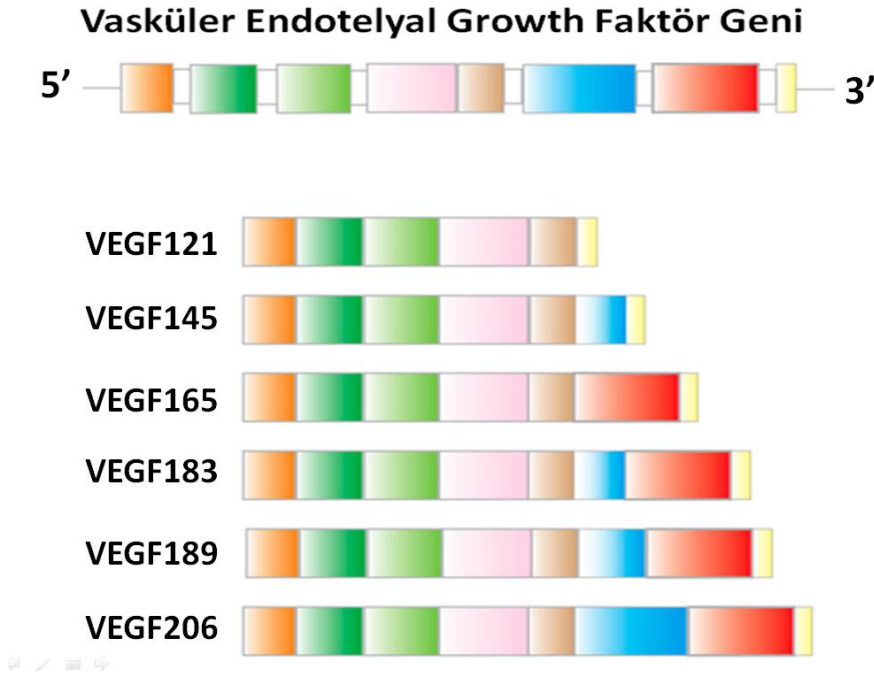
VEGF, 45 kDa ağırlığında, homodimerik bir glikoproteindir. İlk defa 1983 yılında, malign asit sıvısında izole edilmiştir. Vasküler geçirgenliği arttırdığı için, o dönemde Vasküler Permeabilite Faktörü (VPF) veya vaskülotropin olarak ta adlandırılan VEGF, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF'in, aktif makrofajlar, keratinositler, renal glomerüler hücreler gibi birçok hücrede ekspresyonu gösterilmiştir, ancak hipoksiye maruz kalan tüm dokularda, VEGF sentezlenebilmektedir (61-65).

VEGF ailesinin, farklı kaynaklarda değişik şekillerde isimlendirilen altı tane izoformu tanımlanmıştır. Bunlar; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörü (PIGF)'dür.

VEGF-A bazı makalelerde, Human-VEGF veya yalnızca VEGF olarak da adlandırılmaktadır ve VEGF ifadesi kullanıldığında, VEGF-A ve onun 165 aminoasit içeren izoformu kastedilmektedir. VEGF-A'nın, aminoasit sayılarına göre VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆ olmak üzere, altı adet izoformu bulunmaktadır. Bu izoformlar, moleküler ağırlıkları ve biyolojik özellikleri yönünden farklılıklar gösterirler (61,66-68). VEGF sentezi, kromozom 6p21.3 lokalizasyonundaki bir gen tarafından kodlanan mRNA aracılığı ile gerçekleşmektedir (69). VEGF izoformları arasındaki moleküler farklar, bu mRNA'nın alternatif splicing ile translasyonundaki değişikliklerden dolayı oluşmaktadır (70).

Transkripsiyon sonrasında ilk oluşan VEGF mRNA'sı, sekiz adet ekzon bölgesi içermektedir. Bu bölgelerden ilk beş tanesinde translasyon aşamasında bir değişiklik olmazken, 6. ve 7. ekzonlardaki farklılıklar, izoformların oluşumuna sebep olmaktadır. Altıncı ve yedinci ekzonlardaki bu düzenlemeler, molekülün aminoasit sayısı ve heparine bağlanma afinitesinin düzenlemesinde önemlidirler.

En sonda yer alan sekiz numaralı ekzon ise, molekülün hücre yüzeyindeki heparan sülfata ve nörofilin ko-reseptörüne bağlanma özelliklerini belirler. Bu ekzondaki değişiklikler, molekülün pro-anjiyogenik veya anti-anjiyogenik etkiler göstermesinde belirleyici rol oynamaktadır (71).



Şekil 2.2. VEGF mRNA'sından alternatif-splicing ile oluşan VEGF izoformları

Aktif olarak VEGF sentezlenen dokularda çoğunlukla VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃ ve VEGF₁₈₉ izoformları eksprese edilmektedir. Bu izoformlar içerisinde de dominant olan form VEGF₁₆₅'tir. VEGF₁₄₅ ve VEGF₂₀₆ ise, diğer izoformlara oranla daha az sentezlenmektedir (60).

VEGF₁₆₅ bazik bir karaktere sahiptir ve heparine orta derecede bir affinite göstermektedir. VEGF₁₆₅'in bu özelliği, mRNA'da yedinci sıradaki ekzon tarafından kodlanan 44 aminoasit rezidüsü içinde yeralan, 15 adet bazik aminoasidin varlığına bağlanmaktadır. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆, VEGF₁₆₅ 'e ek olarak, altı numaralı ekzon tarafından kodlanan ve heparini güçlü bir şekilde bağlayan bir sekans daha içermektedir. VEGF₁₆₅ salgılandıktan sonra yaklaşık %50-70 oranında endotel

hücre yüzeyine ve ESM'e bağlanarak sekestre olmaktadır. Bu bağlanma, muhtemelen heparan sülfat proteoglikan etkileşimlerine bağlıdır. Buralarda tutulmayan bölümü ise vücut sıvılarına ve dolaşıma geçmektedir. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆'nın ise tamamına yakını ESM'te tutularak sekestre edilmektedir. Altıncı ve yedinci ekzonların kodladığı bu bölgeleri içermeyen VEGF₁₂₁, zayıf asidik özellik göstermektedir ve heparine bağlanmamaktadır. VEGF₁₂₁, salındıktan sonra ESM'te tutulmaz ve tamamına yakını vücut sıvılarına geçer (60,72). VEGF ailesi içerisinde en önemli olan üyenin VEGF-A olduğu düşünülmektedir. VEGF-A izoformları içerisinde anjiyogenik etkinlik bakımından en güçlü uyarıcı, VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ oluşturmaktadır (73).

VEGF ailesinin diğer üyelerinden VEGF-B, VEGF-B geninden başlangıçta 186 aminoasitli bir molekül olarak sentezlenmektedir. Daha sonra uğradığı modifikasyonlarla, 167 aminoasitten oluşan bir sinyal peptidine dönüşmektedir (74). VEGF-B'nin fizyolojik rolü ile ilgili olarak, literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. VEGF-A fizyolojik ve patolojik koşullarda anjiyogeneze sürecinde rol alırken, VEGF-B'nin genellikle patolojik durumlarda ortaya çıkan anjiyogeneze rol üstlendiği düşünülmektedir (75,76). VEGF-B'nin Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptör-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monositlerin aktivasyonu ve farklılaşmalarında rol aldıkları rapor edilmiştir (77). Bir çalışmada VEGF-B defektif farelerin, kardiyak fonksiyonlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, VEGF-B'nin, koroner arterlerin vaskülogenetik oluşumuna katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (78).

VEGF-C, VEGF-A'ya yaklaşık %16'sı benzeyen 388 aminoasit içeren bir moleküldür. VEGF-D benzeri protein olarak da bilinir. Yapısal ve fonksiyonel olarak VEGF-D'ye oldukça benzemektedir. Lenfatik damarların oluşmasında (lenfanjiogeneze) rol oynamaktadır. Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-2 ve 3 (VEGFR-2 ve VEGFR-3)'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotel hücreleri üzerinde mitojenik etki göstermektedir (32,77).

VEGF-D, VEGF-A ile %31 oranında benzer aminoasit dizisine sahiptir ve 334 aminoasitten oluşmaktadır (79). VEGF-D de VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanarak

VEGF-C ile benzer görevler üstlenmektedir (74,77). VEGF-C ve D lenfatik sistem gelişimi için esansiyeldirler.

VEGF-E, %25 oranında VEGF-A ile benzer bir aminoasit dizilimine sahiptir. VEGF ailesinin en son tanımlanan üyesidir. VEGFR-2'ye bağlanarak, güçlü bir şekilde mitojen ve permeabilite artırıcı etki gösterdiği bilinmektedir (77).

PlGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. PlGF adından da anlaşılacağı gibi ilk defa plasentada tespit edilmiştir. Normal embriyonik ya da erişkin dokularda çok düşük seviyelerde sentezlenmektedir. İlk sentezlendiği zaman 131 aminoasitten oluşmaktadır. Ancak, daha sonra yeni aminoasitlerin bu diziye eklenmesi sonucunda 152 aminoasit içeren ve VEGF-A ile %37 oranında aynı aminoasit dizilimine sahip olan son halini alır. PlGF de VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki göstermektedir (74,77). PlGF'ün, patolojik angiogenez sürecinde, VEGF-A aktivitesini tamamladığı ve potansiyelize ettiği rapor edilmiştir (80). VEGF ailesinin üyelerinin bağlandıkları reseptörler ve biyolojik fonksiyonlarının karşılaştırması Tablo 2.1'de görülmektedir.

Tablo 2.1. VEGF Ailesi Üyelerinin Karşılaştırması

VEGF	Reseptör	Fonksiyon
VEGF-A	VEGFR-1 ve 2 NRP-1 ve 2	➤ Anjiyogenez • Endotel hücre mitoz ve migrasyonu • İntegrin aktivasyonu • Lümen formasyonu • Vasküler fenestra oluşumu ➤ Makrofaj ve granülosit kemotaksisi ➤ Vazodilatasyon (NO salınımıyla indirek olarak)
VEGF-B	VEGFR-1	Patolojik anjiyogenez, vaskülogenez
VEGF-C	VEGFR-2 ve 3	Lenfanjiyogenez
VEGF-D	VEGFR-2 ve 3	Lenfanjiyogenez
VEGF-E	VEGFR-2	Endotel hücre mitozu, permeabilite artışı
PIGF	VEGFR-1 NRP-1	Vaskülogenez, Patolojik anjiyogenezde VEGF-A etkisinin potansiyalize edilmesi

2.3. VEGF'ün Biyolojik Etkileri

VEGF'ün tespit edilmiş ilk biyolojik fonksiyonu, vasküler permeabiliteyi arttırmasıdır (81). Vasküler permeabilite artışı sonucunda plazma proteinlerinin anjiyogenezin gerçekleşeceği alanda birikmesi, endotel hücrelerinin migrasyonuna olanak sağlayan, fibrinden oluşmuş bir zemin hazırlamaktadır. VEGF arter, ven ve lenfatik damar endoteli üzerinde güçlü bir şekilde mitojenik etkiye sahiptir (82,91). Bununla birlikte endotel hücrelerinde MMP, PA'leri, vasküler ve intraselüler adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (83). VEGF'ün, in-vitro modellerde, mikrovasküler endotel hücrelerinin kollajen jelle invazyonunu sağlayarak anjiyogenezi aktive ettiği ve kapiller benzeri yapıların oluşumunu uyardığı, yine kollajen jel vasatında, rat aortik halkalarından kapiller filizlenmeyi indüklediği gösterilmiştir (84,85). VEGF endotel hücrelerinde hekzos transportunu arttırmaktadır. Bu etkinin endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi

metabolik olaylar nedeniyle, artan enerji ihtiyacının karşılanmasında önemli olduğu düşünülmektedir (86). VEGF'ün endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin (Vasküler Sellüler Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) ve İntraselüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1)) sentezini arttırması, natural killer hücrelerinin endotel hücrelerine adezyonunun artması ile sonuçlanmaktadır. VEGF'in monosit kemotaksisini arttırabildiği ve granulosit-makrofaj kök hücrelerinin koloni oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (87-89). Birçok çalışmada, patolojik anjiogenez sürecine de esas olarak VEGF salınımının aracılık ettiği rapor edilmiştir (65).

2.4. VEGF Reseptörleri

VEGF biyolojik etkilerini temel olarak şu üç reseptörü ile gerçekleştirmektedir:

1-VEGFR-1: Flt1 (fms-like tyrosine kinase-1)

2-VEGFR-2: KDR/Flk-1 (kinase domain region/fetal liver kinase-1)

3-VEGFR-3: Flt4 (fms-like tyrosine kinase-4)

Bu reseptörlerden VEGFR-1 ve VEGFR-2 vasküler endotel hücre yüzeyinde bulunurken, VEGFR-3 lenf damarlarındaki endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunmaktadır. İlk defa tanımlandıklarında sadece endotel hücrelerinde bulundukları düşünülen (90) VEGF reseptörleri, vasküler düz kas hücreleri, monosit/makrofaj gibi farklı hücreler tarafından da sentezlenebilmektedir (91,92).

Bu reseptörler, hücre membranının dış tarafında (ekstrasellüler) 7 adet immunglobulin (Ig)-benzeri domain, bu domainlerin tutunduğu membranı boydan boya kateden bir bölge (transmembranal bölge) ve membranın hücre içine bakan tarafında bulunan tirozin kinaz domain'inden oluşmaktadır (93).

2.4.1. VEGF Reseptör-1 (VEGFR-1)

Yaklaşık 180 kDa ağırlığında bir glikoprotein olan VEGFR-1 (flt-1), tanımlanan ilk VEGF reseptörüdür (93). VEGFR-1'e, VEGF-A, VEGF-B ve PlGF

bağlanmaktadır. VEGFR-1 vaskulogenez aşamasında esansiyeldir. VEGFR-1 knock out fareler, embriyonik dönemde ortalama 8,5. günde ölmektedir. Bu farelerde endotel hücrelerinin normal bir şekilde proliferere olduğu, ancak bu hücrelerin organize olarak vasküler yapıları oluşturamadığı rapor edilmiştir (94-96).

Endotel hücreleri üzerinde VEGFR-1 aracılığıyla ortaya çıkan, anjiyogenezin temel hücresel aktiviteleri olan proliferatif veya migratuar etkiler net bir şekilde gösterilememiştir. Ancak VEGFR-1'in, endotel hücrelerinde uPA, plasminogen aktivatör inhibitörü-I (PAI-1) ve doku faktörünün ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (97,98).

2.4.2. VEGF Reseptör-2 (VEGFR-2)

VEGFR-2 (flk-1) yaklaşık 200 – 230 kDa ağırlığında bir reseptördür. VEGFR-2, daha önceden keşfedilmiş olan fare fetal karaciğer kinazı-I (flk-1) ile %85 oranında benzer aminoasit dizilimine sahiptir. Bu nedenle Flk-1 veya Kinaz-insert-domaini-içeren reseptör (KDR) olarak da adlandırılmaktadır (99).

VEGFR-1'de olduğu gibi VEGFR-2 de embriyonik dönemde esansiyeldir. VEGFR-2 knock out fareler de, endotel hücrelerinde ortaya çıkan çeşitli gelişim defektlerine bağlı olarak, embriyonik dönemde ortalama 8,5.nci günde ölmektedir (100).

VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin hücre düzeyindeki etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, bu iki reseptörün çok farklı etkilere neden olduğunu göstermektedir. VEGFR-1'in vaskulogenez sürecinde ESM ve hücre etkileşimlerinin kontrolünde etkin rol oynadığı, ancak VEGF'ün esas fonksiyonu olan anjiyogenik uyarıların oluşmasında, zayıf bir etkinliğinin olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, VEGFR-1, VEGF etkinliğini azaltan, tuzak bir reseptör olarak işlev yapmaktadır (101,102). VEGF'e karşı VEGFR-1'in daha yüksek bir affiniteye sahip olmasına rağmen, tirozin kinaz aktivitesi ve intrasellüler yolların aktive edilerek, hücresel cevapların ortaya çıkması gibi temel anjiyogenik olaylar, esas olarak VEGFR-2 aracılığı ile gerçekleşmektedir (103,104).

VEGFR-2; VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve snake-venom VEGF-F (svVEGF)'ün hücrel etkilerine aracılık etmektedir. Farelerde VEGFR-2'nin defektif ekspresyonu, hematopoetik kök hücrelerin, endotel hücrelerinin ve vasküler yapıların gelişiminin kaybı ile sonuçlanmıştır. Bu bulgu, VEGFR-2'nin hem endotelial, hem de hematopoetik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu göstermektedir. Ancak; VEGFR-1 knock-out farelerde, olgun endotel hücreleri oluşabilmektedir. Fakat bu deneklerdeki vasküler yapıların aşırı geniş ve yapısal bozukluklara sahip olduğu gözlenmiştir (103).

VEGFR-2'ye VEGF bağlanması sonucunda, endotel hücrelerinde güçlü bir kemotaktik ve proliferatif cevap ortaya çıkmaktadır (105). İnsan göbek kordonu veninden elde edilen endotel hücre kültüründe (HUVEC), VEGFR-2'nin aktive edilmesinin, anti-apoptotik etkilerin ortaya çıkmasına neden olduğu gözlenmiştir (32). Bu sonuç, VEGFR-2'nin endotel hücre proliferasyonuna aracılık ettiği düşüncesini desteklemektedir. Başka bir çalışmada, VEGFR-2 üretemeyen domuz aortik endotel hücrelerine, sadece VEGFR-2 kodlayan bir plazmid verilmesi sonucunda, bu hücrelerin mitoz geçirdikleri ve kemotaksiste yer aldıkları rapor edilmiştir (93). Bu bulgu, VEGFR-2'nin mitoz ve kemotaksisten sorumlu esas reseptör olduğunu göstermektedir.

2.4.3. VEGF Reseptör-3 (VEGFR-3)

VEGFR-3'de reseptör tirozin kinazların flt alt-ailesinin bir üyesidir. Flt-4 olarak da adlandırılmaktadır. VEGFR-3 lenfatik dokuların endotel hücrelerinde tespit edilmiştir. VEGFR-3'e, VEGF-C ve VEGF-D bağlanmaktadır. Bu reseptörün lenfangiogenezi kontrol ettiği düşünülmektedir.

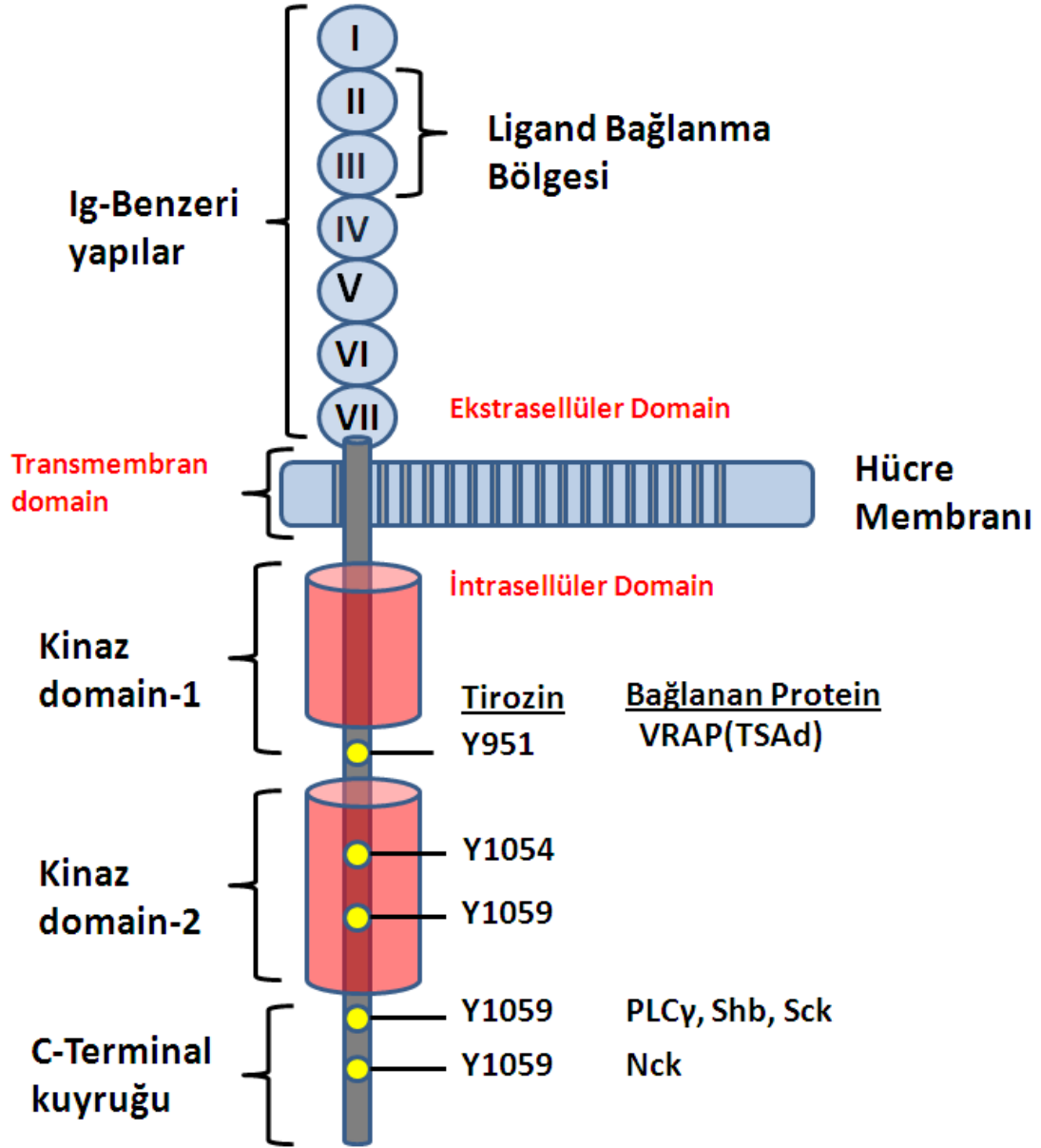
2.4.4. VEGF Reseptör Uyarılması Sonrasında Hücrel Cevaplar

Endotel hücrelerinin VEGF ile uyarılmaya karşı verdiği proliferasyon ve migratuar cevabın, VEGFR-2 aracılığı ile oluştuğu düşünülmektedir. VEGFR-1'in monosit migrasyonunu indüklediği gösterilmiş olmasına rağmen, bu reseptörün uyarılmasıyla, temel anjiyogenik yanıtlar olan endotel hücre migrasyonu ve

proliferasyonu, net bir şekilde gösterilememiştir. VEGFR-1'in bu yanıtları oluşturmamasının sebebi, henüz tam olarak açıklanamamıştır (32).

VEGF, VEGFR-2 ekstrasellüler domain üzerinde, ikinci ve üçüncü Ig benzeri parçalara tutunmaktadır. Bu bağlanma reseptör dimerizasyonunu ve otofosforilasyonu indüklemektedir. Reseptör dimerizasyonundan sonra, intrasellüler kinaz domainler otofosforilasyon için kararlı hale geçerler. VEGFR-2 intrasellüler bölgesinde otofosforilasyonun gerçekleştiği birçok tirozin rezidüsü tanımlanmıştır (106,107). Ancak son zamanlarda memeli hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu rezidüler içerisinde başlıca otofosforilasyon bölgelerinin Y951, Y1054, Y1059, Y1175, Y1214 olduğu rapor edilmiştir (108,109). Bu bölgelerin her birisi, otofosforilasyon sonrasında farklı bir molekül için bağlanma noktası oluşturmaktadır (109-112).

Bu aşamadan sonra VEGFR-2'nin endotel hücrelerinde, ortaya çıkan fizyolojik etkileri dört başlık altında incelenir: proliferasyon, migrasyon, anti-apoptotik etki ve permeabilite artışı.



Şekil 2.3. VEGFR-2'nin moleküler yapısı.

2.2.4.1. Proliferasyon

VEGF endotel hücreleri üzerinde VEGFR-2 tirozin kinaz aktivitesi ile klasik Erk (Extracellular signal-regulated kinases) yolağını aktive ederek, endotel hücre proliferasyonunu uyarmaktadır (113). Y1175 bölgesinin otofosforilasyonu, bu bölgeyi fosfolipaz-C γ (PLC γ) bağlanmasına uygun hale getirir. Bu bölgeye bağlanan PLC γ fosforile olarak katalitik aktivitesi artmaktadır. Aktive olmuş PLC γ membran fosfolipidleri ve fosfotidilinozitol 4-5 bifosfatı hidrolize ederek, hücre içi diaçilgliserol (DAG) ve inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) seviyelerinin artmasına neden olur. DAG protein kinaz-C'yi (PKC) aktive ederken IP3 ise hücre içi kalsiyum seviyelerinin artmasına sebep olur. PKC izoformlarından PKC α , PKC ζ ve PKC β 'nın, endotel hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir (113-115). Kalsiyum varlığında aktif PKC'ler Raf/MEK/ERK (Serin-treonin kinaz (Raf) / MAPK/ERK Kinase (MEK) / ERK) yolağının aktivasyonu ile doğrudan gen transkripsiyonunu düzenleyerek hücresel proliferasyona neden olurlar.

2.2.4.2. Migrasyon

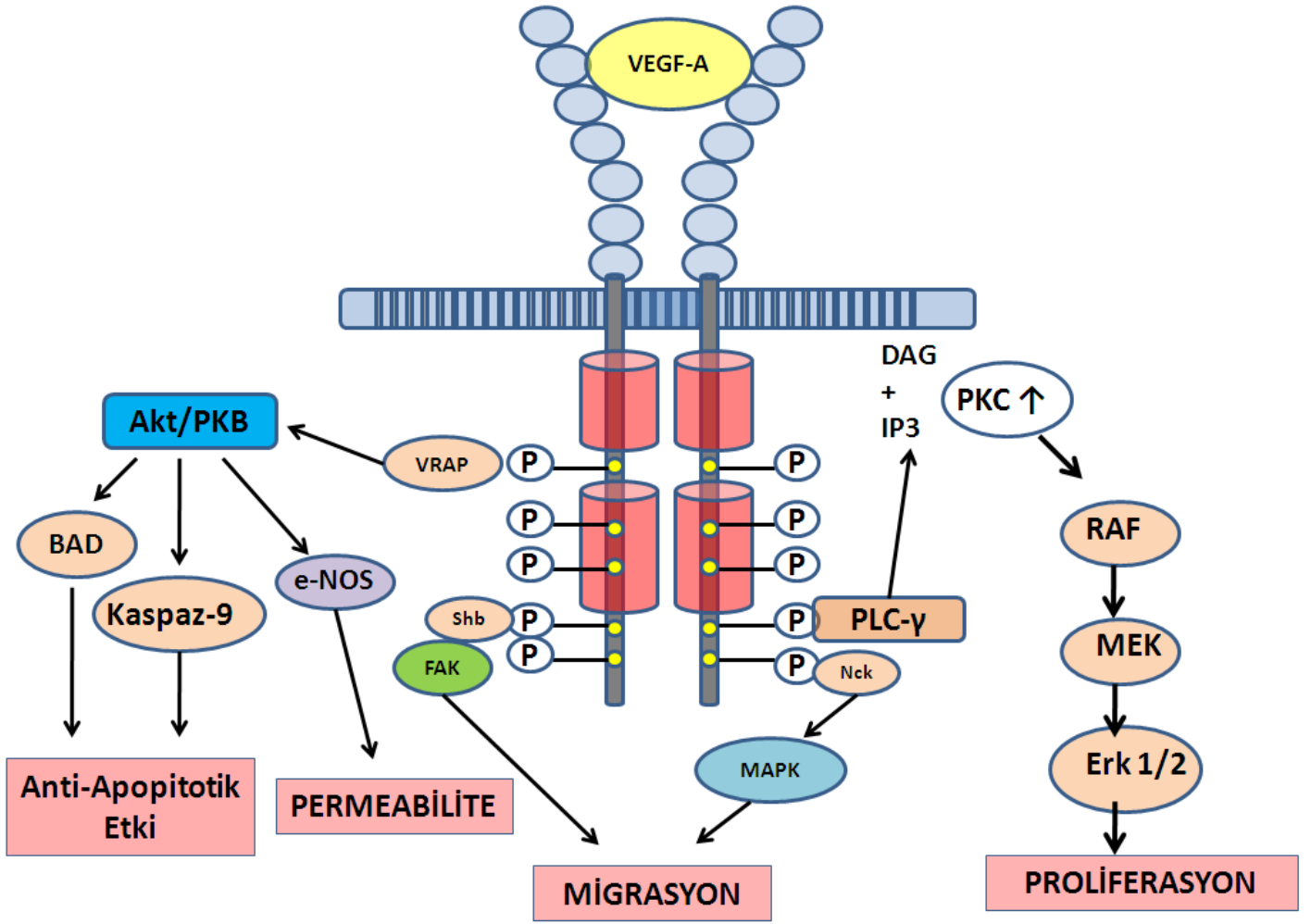
Migrasyon anjiyogenik cevabın önemli bir komponentidir. VEGF ve diğer anjiyogenik faktörlerin konsantrasyon gradienti yönünde, anjiyogenik uyarının merkezine doğru gerçekleşmektedir. Migrasyonun düzenlenmesinde adaptör protein Shb (Src homology 2 domain-containing adaptör protein B)'dir. Shb fosforile Y1175 bölgesine bağlanarak aktive olduktan sonra Fokal Adezyon Kinaz (FAK) gibi bazı proteinlerin aktive edilmesine aracılık etmektedir (116,117). Migrasyonda önemli bir diğer VEGFR-2 bölgesi Y951'dir. Bu bölgenin fosforile olmasıyla VRAP/TSAd buraya bağlanmaktadır. Bu proteinlerin aktif hale geçmesi ile PI3K aktivasyonu ve PIP3 seviyelerinde artma ortaya çıkar. PIP3 düşük moleküler ağırlıklı GTP bağlayan protein Rac'ın ve Gab-1'in aktivasyonuna, bu da membran hareketlerine ve hücre motilitesine yol açarak, hücreler uyarının yoğun olduğu bölgeye doğru göç ederler (118-120).

2.2.4.3. Anti-Apopitotik Etki

Hücre içi PIP3 seviyelerinin artması fosfoinozitid-bağımlı kinaz 1 ve 2'yi aktive ederek protein kinaz B'nin (PKB/Akt) fosforillenmesini sağlamaktadır (121). Akt, BAD (Bcl-2 associated death promoter) ve kaspaz-9'u direk olarak fosforilleyerek, her ikisinin apopitotik aktivitesini inhibe etmektedir (122,123). VEGF ayrıca anti-apopitotik proteinler olan Bcl-2 ve A1'in ve apopitoz inhibitörleri olan XIAP ve survivin proteinlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (124,125). VEGF bu etkilerle endotel hücrelerinin yaşam süresini uzatarak, anjiyogenik etkinliğini arttırmaktadır.

2.2.4.4. Permeabilite Artışı

VEGF'ün anjiyogenik süreçte önemli bir fonksiyonu da vasküler permeabilitenin artmasıdır. Permeabilite artışı sonucu, damar dışına küçük yapıllı moleküller ve sıvı çıkışı olmaktadır. VEGFR-2 bu etkisini fenestrasyon, transsellüler gap ve vezikülo-vakouler organ oluşumu gibi mekanizmalarla gerçekleştirmektedir (126,127). VEGFR-2'nin permeabilite artışına yol açan bu etkisi endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS) sentezlediği nitrik oksit aracılığıyla gerçekleşmektedir (128). eNOS aktivitesi, PLCγ-bağımlı kalsiyum artışı ve PKB/Akt'nin eNOS'un serin rezidüsünü fosforile etmesi sonucunda artmaktadır (129,130). VEGFR-2 ayrıca Erk 1/2 yolağı üzerinden sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA2) aktivasyonuna ve sonuçta prostasiklin (PGI₂) sentezine yol açarak vasküler düz kaslarda gevşemeye neden olmaktadır. Bu etki sonrasında vazodilatasyon ve doku kanlanması artışı ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmanında vasküler permeabilite artışında rol oynadığı düşünülmektedir (131,132).



Şekil 2.4. Hücre içi VEGF etki mekanizmaları.

2.5. Anjiyogenezde Etkili Diğer Reseptörler

2.5.1. Nörofilin-1 (NRP-1)

Endotel hücreleri VEGFR'lerinden daha küçük boyutlarda, nörofilin-1 (NRP-1) olarak adlandırılan bir reseptör daha içerirler. NRP-1, 120 – 130 kDa ağırlığında, semaphorin ailesinin bazı üyeleri için, nöronal bir reseptör olarak daha önceden

tanımlanmış bir glikoproteindir. NRP-1'in tümör kökenli hücreler ve endotel hücreleri de dâhil olmak üzere çok geniş bir doku dağılımı mevcuttur. NRP-1 gelişme döneminde aksonal büyümenin kontrolünde rol oynamaktadır.

NRP-1 eksprese eden hücrelerde VEGF'ün VEGFR-2'ye daha etkin bir şekilde bağlandığı rapor edilmiştir (133). NRP-1, VEGF'ün reseptörüne bağlanmasında ko-reseptör olarak görev yapmakta ve VEGF'ün (VEGF₁₆₅'in) reseptörüne tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Bu durum VEGF₁₆₅'in VEGF₁₂₁'den daha potent anjiyogenik etki göstermesinin sebebi olarak yorumlanmıştır (68,134).

2.5.2. Çözünebilir VEGF Reseptörü-1 (sVEGFR-1)

VEGFR-1 kodlayan gen, alternatif splicing yoluyla farklı ikinci bir reseptör daha sentezleyebilmektedir (135). Bu ikinci reseptör; tam boy uzunlukta, membrana bağlanan ve VEGF'ün bazı hücrel etkilerine aracılık eden VEGFR-1'in 7 adet ekstrasellüler Ig-benzeri parçasının ilk 6 tanesinden oluşan sVEGFR-1'dir. İlk defa, 1990 yılında yapılan bir çalışmada, sVEGFR-1 sentezine aracılık eden mRNA'ya ait cDNA izole edilmiş ve fms reseptör ailesi ile benzerliği tespit edilmiştir (93). Daha sonra yapılan çalışmalarda, preeklamps, meme kanseri, beyin iskemisi gibi bazı patolojik durumlarda, plazmadaki sVEGFR-1 seviyelerinin yükseldiği rapor edilmiştir (136-138). Yine aynı hasta gruplarında VEGF ve PlGF seviyeleri de yüksek bulunmuştur (139).

VEGFR-1'in ligand bağlanma bölgesi, hücre dışı ikinci ve üçüncü Ig-benzeri parçalar olarak belirlenmiştir. Dördüncü parçanın reseptör dimerizasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (140,141). Bu parçalar sVEGFR-1 bünyesinde de aynı işlevleri görmektedir.

VEGFR-1'in VEGF'e affinitesi VEGFR-2'den yaklaşık on kat kadar daha fazladır. Benzer şekilde, sVEGFR-1'in de VEGF affinitesi, VEGFR-2'den çok daha yüksektir. Bu noktadan hareketle, anjiyogenezin aktif bir şekilde rol üstlendiği bazı patolojik süreçlerde, sVEGFR-1'in anti-anjiyogenik bir ajan olarak kullanılabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Bu yönde yapılan ilk çalışmalarda hücre kültürü ve bazı

havyan modellerinde, sVEGFR-1'in tümör büyümesini durdurduğu ve tümör kitlesinde küçülmeye neden olduğu rapor edilmiştir (142,143). Ancak, henüz rutin kullanıma girmiş, sVEGFR-1 temelli herhangi bir tedavi modalitesi bulunmamaktadır.

sVEGFR-1 dolaşımda VEGFR-1'in kompetitif inhibitörü gibi görev yapmaktadır. sVEGFR-1, VEGF'e bağlanarak bu molekülün aktivitesini engellemektedir. Bununla birlikte, VEGF reseptörleri ile etkileşime girerek, heterodimerizasyona neden olmakta ve böylece sinyal iletimini engellemektedir. Ancak sVEGFR-1'in organizmadaki fizyolojik rolü, henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (144).

2.5.3. Çözünebilir VEGF Reseptörü-2 (sVEGFR-2)

sVEGFR-1 tanımlandıktan sonra, uzun bir süre bu reseptörün doğal olarak bulunan tek çözünebilir VEGF reseptörü olduğu düşünülmüştür. 2004 yılında Ebos ve ark. fare ve insan plazmasında çözünebilir VEGFR-2'yi tespit ettiklerini rapor etmiştir (145). Çözünebilir reseptörler organizmada alternatif splicing yoluyla veya orijinal reseptörün proteoliz ile parçalanması sonucunda oluşmaktadır. sVEGFR-1'in alternatif splicing yoluyla oluştuğu bilinmektedir ancak, sVEGFR-2'nin nasıl sentezlendiği henüz aydınlatılamamıştır.

sVEGFR-2'nin, sVEGFR-1'den farklı olarak VEGF-A'ya bağlanma affinitesi düşüktür. Fakat VEGF-C'yi güçlü bir şekilde bağlamakta ve bu ligand için VEGFR-3 ile yarışmaktadır. Bu şekilde sVEGFR-2'nin lenfanjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (146).

2.6. Anjiyogenez Modelleri

Anjiyogenez birçok hücre tipi ve çok sayıda molekülün katıldığı, çok basamaklı ve oldukça karmaşık bir süreçtir. Dokuların ve moleküllerin heterojenitesi, anjiyogenik reaksiyonların hücresel karmaşıklığı düşünüldüğünde, deneysel ortamda tek bir modelin veya ölçüm yönteminin anjiyogenik sürecin

değerlendirilmesinde yeterli olamayacağı açıktır. Bu nedenle anjiyogenez çalışmalarında pek çok in-vivo ve in-vitro model kullanılmaktadır.

Anjiyogenez araştırmalarının temel zorluklarından birisi, anjiyogenik cevabın rahatça gözlenebileceği ve kantite edilebileceği, her açıdan kullanışlı bir metodun bulunmamasıdır. Gerek in-vitro, gerekse in-vivo modellerin hemen hepsi için bazı avantaj ve dezavantajlar söz konusudur. Bu bakımdan yapılacak olan araştırmanın amacına uygun bir modelin seçilmesi önem arzeder. Optimal bir anjiyogenez modelinden, genellikle beklenen özellikler şunlardır:

- 1- Hızlı sonuç alınan, rutinde kolay uygulanabilen, tekrarlanabilirliği yüksek, güvenilir ve ucuz olmalı,
- 2- Uzun süreli ve non-invaziv görüntülemeye imkân tanımalı,
- 3- İn-vitro ortamda alınan anjiyogenik yanıt, in-vivo olarak da doğrulanabilmeli,
- 4- Metodun uygulanması esnasında doku hasarı riski en az seviyede olmalı (doku hasarı anjiyogenezi tetiklemektedir),
- 5- Yeni oluşan vasküler yapılar ile hâlihazırdaki mevcut vasküler yapılar rahatça ayırt edilebilmeli,
- 6- Yeni oluşan vasküler yapıların, vasküler uzunluk, birim alandaki damar sayısı, bazal membran genişliği gibi, anjiyogenik parametrelerin kantitatif olarak ölçümüne imkân tanımalı,
- 7- Model, yeni oluşan vasküler yapıların fonksiyonel özelliklerinin (migrasyon, proliferasyon, tüp formasyonu oluşum oranı, kan akım oranı, permeabilite gibi) ölçümüne imkân tanımalı,
- 8- Uygulanan anjiyogenik/anti-anjiyogenik ajanın salıverilme hızı, dağılımı ve farklı bölgelerdeki konsantrasyonu tahmin edilebilmelidir.

2.6.1. İn-vitro Modeller

İn-vitro anjiyogenez modellerinin başlıcaları; hücre, doku, organ ve embryo kültürleridir. Bu modellerin kullanımı, hayvan modelleri göz önüne alındığında, fazlaca teknik beceri gerektirmemektedir. Maliyet olarak, hayvan modellerinden

daha ucuzdurlar ve kolayca elde edilebilirler. Anjiyogenezele ilgili bazı parametrelerin kantifikasyonu, bu tür modellerde daha kolaydır. Ayrıca bazı metodlarda, otomatize olarak hücre sayısı, büyüklüğü vb. gibi parametrelerin ölçümü mümkün olmaktadır. Genetik manipölasyonlara (adenovirüs enfeksiyonu veya transfeksiyon vb. yoluyla) imkân tanımları, ayrı bir avantajlarıdır. Etkinliğı değerlendirilmek istenen ajanın uygulanması, hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Uygulama sonrasında, yorumlanması kolaydır. Kültür ortamında, reaksiyonun gerçekleşeceği çevresel şartlar kontrol edilebilmektedir. Böylece, hedef hücre grubunun dışındaki hücrelerin veya organizmanın sürece katkısı dışlanabilmektedir. Ancak in-vitro modellerin bu tür avantajlarının yanında, bir takım dezavantajları da bulunmaktadır.

İn-vitro anjiyogeneze modellerinden hücre kültürü; hücre proliferasyonu, hücre migrasyonu, tüp formasyonu oluşumu gibi, endotel hücresinin anjiyogeneze boyunca geçirdiğı aşamaları yansıtan modellerdir. Dolayısıyla yapılan uygulamanın hangi evrede, anjiyogenezi nasıl etkilediğı konusunda, bu modeller oldukça aydınlatıcı fikirler verebilmektedir. Ancak endotel hücreleri; organizmada arterler ve venler arasında, büyük ve küçük damarlarda, farklı organlar arasında, normal ve tümöral dokular arasında oldukça ciddi yapısal ve fonksiyonel farklılıklar içermektedir (147,148). Ayrıca anjiyogeneze süreci, mikro ve makro vasküler yapıların birlikte görev aldığı karmaşık bir süreçtir. Bu tür nedenlerden dolayı, hücre kültürü modelleri tek başına, organizmanın anjiyogenik/anti-anjiyogenik cevabını net bir şekilde yansıtamamakta, genellikle bu modellerden elde edilen sonuçların, in-vivo bir modelle doğrulanması gerekmektedir. Hücre kültürlerinde, tekrarlayan pasajlar sonrasında hücre morfolojisi orijinal yapılarından uzaklaşmaktadır. Bu durum, yapılan uygulamanın etkinliğinin değerlendirmesini zorlaştırmaktadır. İn-vitro modeller, klinik çalışmalarda uygulanacak dozun belirlenmesinde, yeterli bilgi vermemektedir. Bakteriyel, viral vb. kontaminasyonlar da hücre kültürlerinin ayrı bir dezavantajı olarak görülmektedir. Günümüzde anjiyogeneze araştırmalarında sıkça kullanılan hücre kültürü modellerinden birisi,

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) olarak adlandırılan, umbilikal venden elde edilen hücrelerle oluşturulmuş bir modeldir.

Anjiyogenezin gerçekleştiği bölgede endotel hücrelerinin dışında, endotel hücrelerini çevreleyen düz kas hücreleri, perisitler, fibroblast vb. diğer hücreler, mikroçevredeki ESM ve farklı dokulardan salgılanan pek çok sitokin ve büyüme faktörü bulunmaktadır. Tüm bu faktörler, anjiyogenik süreci değişik şekillerde etkilemektedir. Bu nedenle; sadece endotel hücrelerinin, tek başına tüm süreci yansıtmakta yetersiz kalacağı düşünülerek; anjiyogenez araştırmalarında doku, organ ve embryo kültürü modelleri kullanılmaya başlanmıştır. Bu modellerin başlıcaları domuz-sığır-civciv aortik ark modelleri, rat-fare aortik halka modeli, fetal rat-fare metatarsal kemik modeli, civciv embriyo kültürüdür. Bu tür modellerde yeni oluşan vasküler yapıların, gözlenerek veya dijital görüntüleme yöntemleriyle uzunluk, birim alandaki damar sayısı vb. parametrelerle ölçümü mümkün olmaktadır. Anjiyogenez çalışmalarında hata kaynaklarından biri olan inflamasyonun dışlanması, bu modellerin diğer bir avantajıdır.

Bu modeller, hücre kültürlerine nazaran, organizmanın anjiyogenik cevabı hakkında daha değerli bilgiler vermektedir. Ancak bu modellerin de bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Halen bu tür modellerde anjiyogenez parametrelerinin ölçümü standardize edilmemiştir. Bu modeller anjiyogenik cevabı taklit etmede başarılı olsalar da, hastalık durumlarını, tümör vb. dokulardan salgılanan faktörlerin etkilerini araştırmak için yeterli değildir. Bu modellerin en önemli dezavantajlarından bir tanesi, kültüre edilen dokuların farklı bir türe ait olmasıdır. Gözlenen anjiyogenik/anti-anjiyogenik cevabın, türe özgün olma ihtimali bulunmaktadır. Bu durumda, elde edilen bilgilerin, insan organizması için de geçerli olduğunu söylemek zorlaşmaktadır. Dolayısıyla bu modellerle elde edilen bilgilerin de, in-vivo bir modelle doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6.2. İn-vivo Modeller

Anjiyogenez çalışmalarında kullanılan in-vitro modeller; uygulanan ajanın in-vivo ortamda nasıl bir etki göstereceği konusunda fikir vermemektedir. Bu nedenle

bu tür çalışmalar için pek çok in-vivo model önerilmiştir. Anjiyogenez çalışmalarında kullanılan başlıca in-vivo modeller; civciv koryoallantoik membran (CAM) modeli, rat-fare-tavşan korneal micropochet modeli, dorsal hava kesesi modeli, tümör implant modelleri, zebrabalık modeli, hind-limb iskemi modeli, sünger ve polimer implant modelleridir. Bu modeller arasında, tekrarlanabilirliği yüksek, uygulaması kolay, ucuz ve kolay elde edilebilen, anjiyogenezin kantitatif ölçümüne imkân tanıyan en uygun modellerin CAM ve korneal micropochet modelleri olduğu kabul edilmektedir (149).

2.6.3. Civciv Koryoallantoik Membran (CAM) Modeli

CAM modeli, kanser-metastaz araştırmalarında ve biyolojik materyallerle ilgili çalışmalarda uzun süredir kullanılmaktadır. Yakın tarihte Folkman tarafından anjiyogenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (150).

CAM, döllenmiş tavuk yumurtasında, allantoisin splanknik mezodermi ile koryonun somatik mezoderminin birleşmesinden oluşmaktadır. Bu birleşme inkübasyonun yaklaşık 3. ve 4. günleri arasında olmaktadır. Her iki membranın birleşmesini takiben CAM, 12. güne kadar hızlı bir şekilde gelişmesini sürdürerek, yumurta kabuğunun tüm iç yüzeyini kaplamaktadır. Bu günden sonra endotel hücrelerinin proliferasyonunda hızlı bir düşüş gözlenir. CAM, civciv embryosu için respiratuar organ görevi görmektedir. Bununla birlikte, allantois kesesinden sodyum ve klorun, yumurta kabuğundan kalsiyumun embriyonik damarlara geçişinde aracılık etmektedir.

CAM'da anjiyogenez üç aşamada incelenmektedir:

- 1- Erken faz: 5-7. günler arası,
- 2- Ara faz: 8-12. günler arası,
- 3- Geç faz: 12. günden sonrasındır.

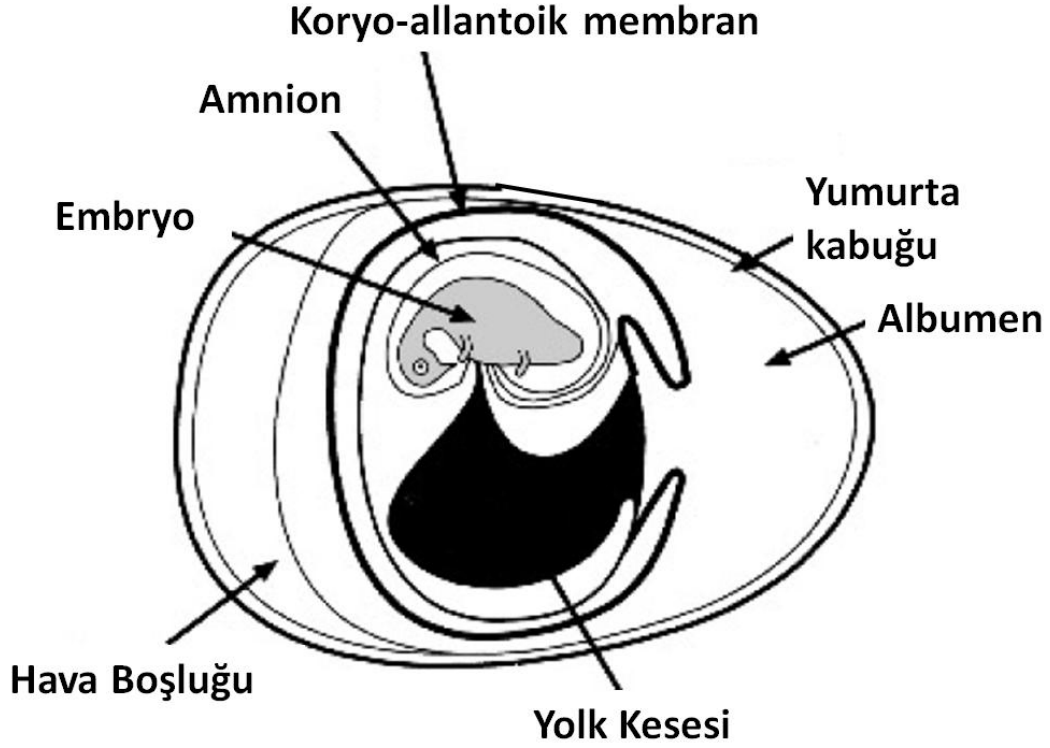
Erken faz, koryoallantoik membranın füzyonundan sonra, ilk olarak kapiller filizlenmenin başladığı dönemdir. Ara fazda, mikrovasküler ağın gelişimi tamamlanmaktadır. Geç fazda ise, oluşmuş vasküler yapılar genişleyerek, son

halini almaktadır. Bu model kullanılarak yapılan çalışmalarda, uygulama yapmak için en uygun zamanının hangi faz olduğu konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Uygulamalar, inkübasyonun 5. gününden 18. güne kadar yapılabilmektedir. 18. günden sonrasında ise, fetüsün büyümesi ve hareketlerinin artması, uygulamayı olumsuz etkilemektedir. Uygulama sonrasında değerlendirmenin ne zaman yapılacağı konusunda da tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. Ancak genel olarak; anjiyogenik bir uygulama yapılmışsa 72-96 saat sonra, anti-anjiyogenik bir uygulama yapılmışsa 48 saat sonra sonuçların değerlendirilmesinin uygun olduğu görüşü kabul edilmektedir.

Kullanılacak yumurtaların kolay temin edilebilmesi ve ucuz olması, bu modelin önemli avantajlarından birisidir. Ayrıca uygulamanın sonuçları, çok kısa sürede elde edilmektedir. Bu bakımdan çok sayıda deneyi, seri şekilde yapmak mümkün olmaktadır. Sonuçlar gözle değerlendirilebildiği gibi, stereozoom mikroskop yardımıyla detaylı inceleme mümkündür. Uygulama alanından alınan örnekler, ışık mikroskobu veya elektron mikroskobu ile değerlendirilebilmektedir. Fikse edilmeyen örneklerde, farklı protein yapılar (VEGF, FGF vb.) ölçülebileceği gibi, ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yardımıyla gen ekspresyon düzeyleri ölçülebilmektedir. Tüm bu bakımlardan, CAM modeli anjiyogenik/anti-anjiyogenik etkinlik değerlendirilmesinde, en kullanışlı in-vivo model olarak kabul görmektedir (151,152).

Ancak CAM modelinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Non-spesifik inflamatuvar reaksiyonlar bu dezavantajların en önemlilerindendir. Fiziksel ve kimyasal travmaların inflamasyonu tetiklemesi nedeniyle, her türlü travmadan korunmak gerekmektedir. Dolayısıyla travmaya neden olacak uygulamalar için, bu model kullanışlı değildir. İnflamasyon kaynaklarından biriside, yumurta açılırken uygulama alanına düşen yumurta kabuğu tozları ve parçalarıdır. Bu nedenle, kabuk parçalanırken olabildiğince temiz çalışılmalıdır. Bu modelin bir diğer dezavantajı, artmış vaskülarizasyonun, normal anjiyogenez ile ayrımının zorluğudur. Uygulama için kabukta açılan pencerenin izolasyonu ve havayla

temasın çok iyi bir şekilde önlenmesi gerekmektedir. Çünkü basınç ve nem değişiklikleri, deney sonuçlarını etkileyebilmektedir.



Şekil 2.5. Döllenmiş yumurta, embryo ve zarların şematik gösterimi.

2.7. Amaç:

Anjiyogenez, organizmada menstrüel siklus ve yara iyileşmesi gibi birkaç fizyolojik olay dışında oldukça kısıtlanmıştır. Ancak, inflamatuvar hastalıklar, kanser, tümör metastazları gibi pekçok patolojik olayda, önemli bir rol oynamaktadır. Bu bakımdan, anjiyogenezin engellenmesi veya aktive edilmesi, bu tür hastalıkların seyrini değiştirebilecektir. Günümüzde anti-anjiyogenik etki mekanizması ile kanser tedavisinde kullanılan, FDA onayı almış bir takım ilaçlar kullanıma girmiştir. Yara iyileşmesinin geciktiği bazı klinik durumlarda da, anjiyogenik faktörleri içeren pansuman preparatlarının, deneysel olarak başarılı olduğunu belirten çalışmalar rapor edilmiştir (153,154).

sVEGFR-1'in organizmadaki fizyolojik rolü henüz aydınlatılamamıştır, ancak, anti-anjiyogenik etkinlik göstererek, anjiyogenezin kontrol altında tutulmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Rekombinant human sVEGFR-1'in, CAM modelinde anti-anjiyogenik etkinliği ile ilgili bir çalışma, henüz yapılmamıştır. Biz de bu çalışmada, rekombinant human sVEGFR-1'in CAM modelinde anti-anjiyogenik etkinliğinin öncelikle makroskobik olarak gösterilmesi, daha sonra bu makroskobik etkinlik ile VEGF ve VEGF'le ilgili reseptörlerin gen ekspresyonlarını ortaya koyarak, moleküler düzeyde anjiyogenezle ilgili değişime ışık tutmayı amaçladık.

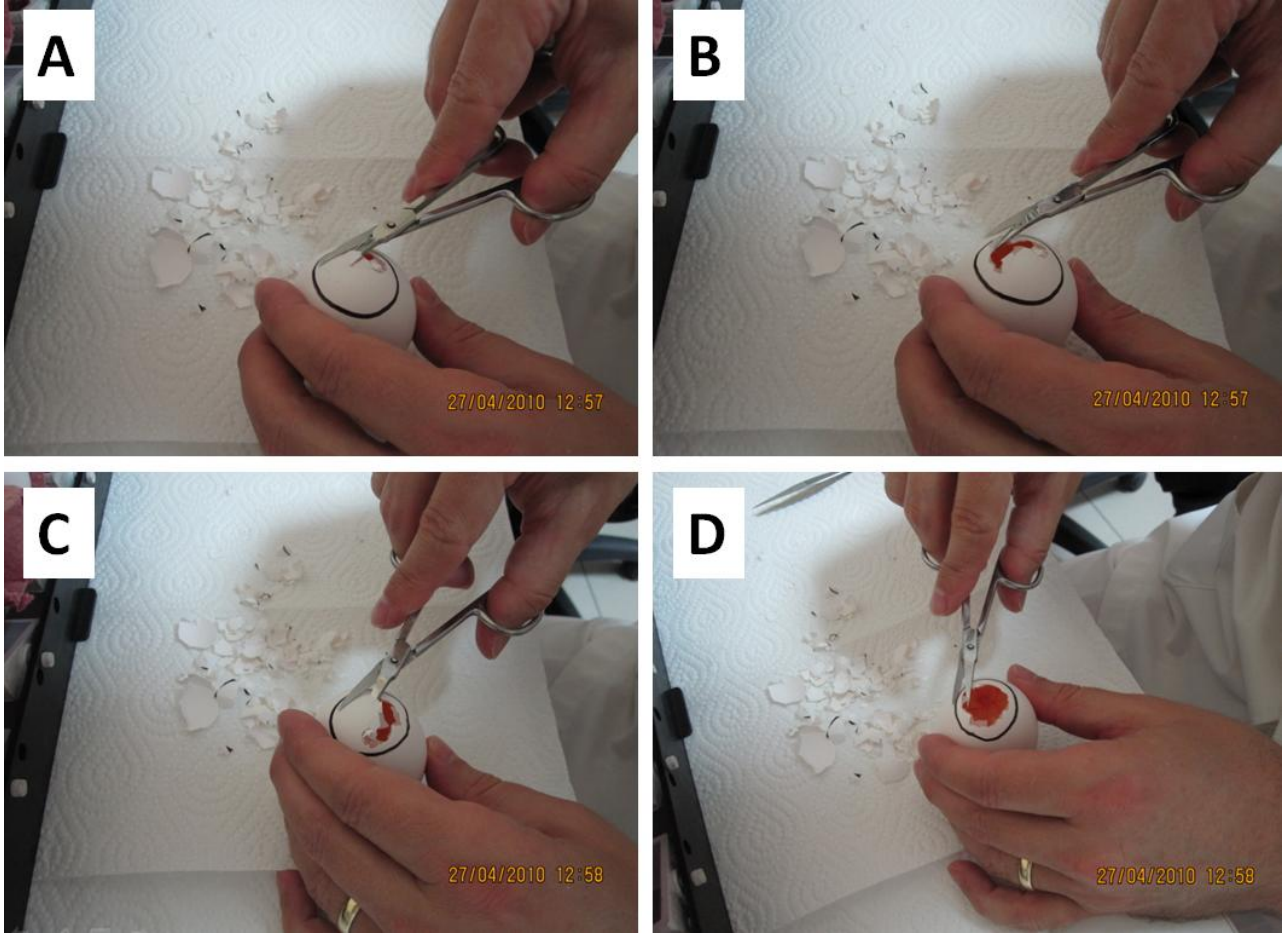
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Deneye Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak Atak-S cinsi döllenmiş yumurtalar Tavukçuluk Enstitüsünden (Ankara, Türkiye) temin edildi. Yumurtalar çalışma boyunca uygun şartlar altında (37 °C ve yaklaşık %75 nemli ortamda), kuluçka makinesinde muhafaza edildi. İnkübasyonun 5. gününde, önce karanlık bir odada ışık kaynağı yardımıyla, transilüminasyondan faydalanarak civciv embryosunun yeri tespit edildi. Yumurtaların dış yüzeyi %70'lik etanolle temizlendi. Daha sonra yumurtaların işaretlenmiş kısımlarından yeterli miktarda bir pencere açılarak uygulamanın yapılacağı koryoallantoik membrana ulaşıldı.



Şekil 3.1. Karanlık odada ışık kaynağı yardımıyla civciv embryosunun yerinin tespit edilmesi.



Şekil 3.2. İnkübasyonun 5. gününde yumurtalara uygulama yapmak üzere uygun bölgeden kabuğun kırılarak pencere açılması.

3.2. Gerekli Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeler

3.2.1. Atak S cinsi dölllenmiş tavuk yumurtası (Tavukçuluk Enstitüsü, Ankara, Türkiye)

3.2.2. Kuluçka makinası (CİMUKA, Ankara, Türkiye)

3.2.3. Canon powershot SD780IS Dijital Fotoğraf makinesi (ABD)

3.2.4. Cerrahi makas

3.2.5. Pens

3.2.6. Pipetler

- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)
- Pastör pipeti

3.2.7. NANOpureUV Saf su cihazı (Barnstead, ABD.)

3.2.8. Hassas terazi (Precisa, İsviçre)

3.2.9. Nüve SL 350 Çalkalayıcı (Nüve, Türkiye)

3.2.10. Mikrosantrifüj (Hettich, Micro 120, Almanya)

3.2.11. Santrifüj (NF1215, Nüve, Türkiye)

3.2.12. Fosfat tampon tuzları (PBS) pH:7,4 (Sigma, ABD.)

3.2.13. Etanol %70'lik (Merck, Almanya)

3.2.14. Agilent 1100 series Spektrofotometre (Almanya)

3.2.15. Biorad I-cycler thermal cycler (USA)

3.2.16. Parafilm

3.2.17. Işık kaynağı

3.2.18. Roche Lightcycler 2.0 RT-PCR cihazı (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Almanya)

3.2.19. High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

3.2.20. Transcriptor High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

3.2.21. Lightcycler Tagman Master kiti (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)

3.2.22. UPL probe (VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz'a (GAPDH) ait,) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Almanya)

3.2.23. Civciv VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 α , GAPDH'a ait, RT-PCR Primerleri (Alpha DNA, USA):

3.2.23.1. VEGF-A mRNA primeri Forward: 5' TGAGACCCTGGTGGACATTT 3', Reverse: 5' CACACAGGATGGCCTGAATA 3'

3.2.23.2. HIF-1 α mRNA primeri Forward: 5' GGCCTGAGGTCAATCATCTG 3', Reverse: 5' TGTGCGCAGTTCAGTAGCA 3'

3.2.23.3. VEGFR-1 mRNA primeri Forward: 5' AAGGCACAGTGGAGAGATCG 3', Reverse: 5' CAGCCACACAGGTACAGGTC 3'

3.2.23.4. VEGFR-2 mRNA primeri Forward: 5' GGGGAAGATGTACTCGGTGA 3', Reverse: 5' CATCCATGTTCAAACATCACAA 3'

3.2.23.5. VEGFR-3 mRNA primeri Forward: 5' CACATTGGAAACCACCTCAA 3', Reverse: 5' ACCATTGGGTTTGGTACAGG 3'

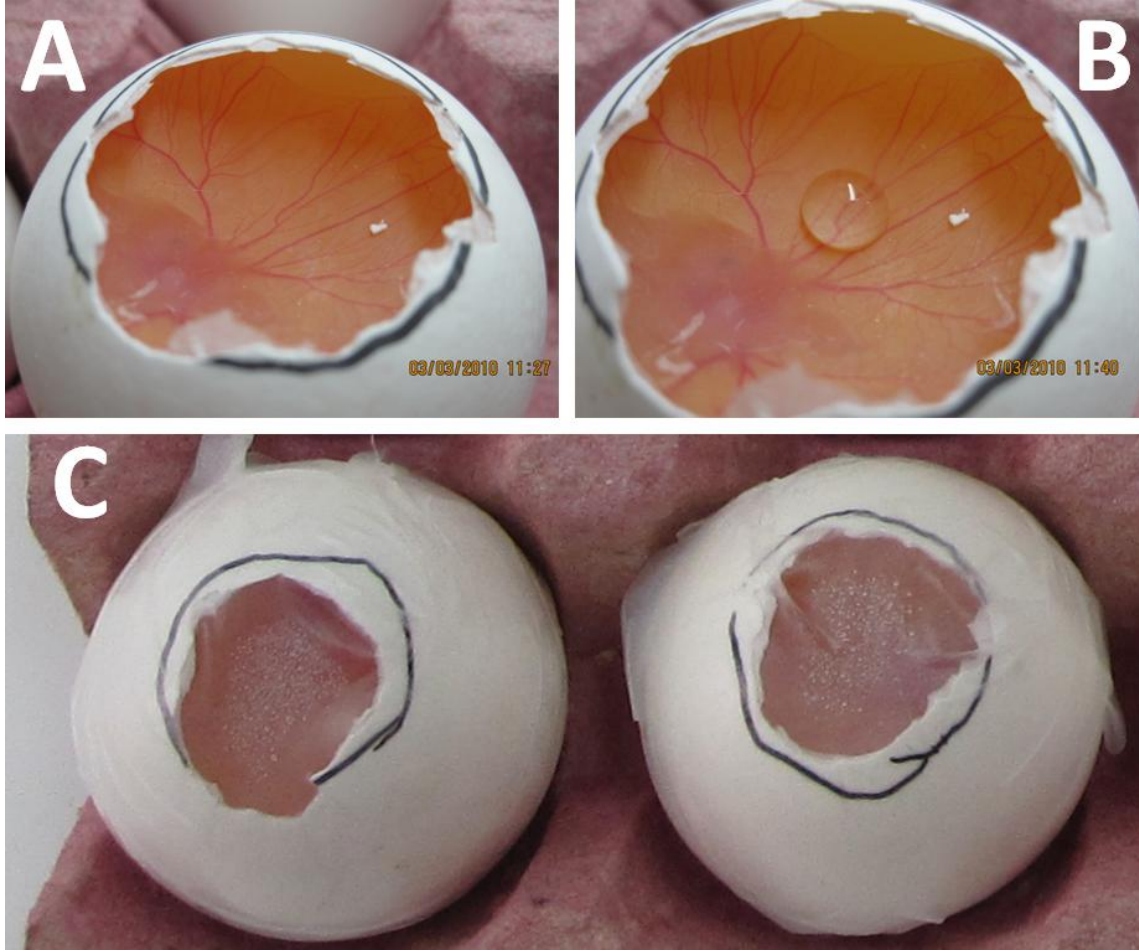
3.2.23.6. GAPDH mRNA primeri Forward: 5' GTCCTCTCTGGCAAAGTCCA 3', Reverse: 5' ACCATGTAGTTCAGATCGATGAAG 3' dizilimine sahiptir.

3.2.24. Recombinant human soluble VEGFR-1 (RD Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxford, UK.)

3.3. sVEGFR-1'in CAM'a Uygulanması

Liyofilize haldeki 20 ng sVEGFR-1 üzerine 200 μ L distile su eklenerek, çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bekletildi. Bu şekilde 5 ng/ 50 μ L (yüksek dozaj) konsantrasyonlu sVEGFR-1 solüsyonu elde edildi. Bu solüsyon, distile su ile dilüe edilerek 2ng/50 μ L (orta dozaj) ve 1 ng/ 50 μ L (düşük dozaj) konsantrasyonlu uygulama solüsyonları hazırlandı. Karanlık odada inkübasyonun 5. Günündeki yumurtalarda embryonun lokalizasyonu ışık kaynağı yardımıyla belirlenerek, işaretlenen bölgeden bir uygulama penceresi açıldı ve hazırlanan solüsyonlar CAM üzerine 50 μ L damlatılarak uygulandı. Çalışma grupları, farklı konsantrasyonlardaki solusyonlar için 8'er adet yumurta olarak belirlendi. Uygulama gruplarının dışında 8

adet yumurta kontrol grubu olarak alındı. Dijital fotoğraf makinesi yardımıyla uygulama öncesinde ve sonrasında, tüm yumurtaların fotoğrafı çekildi. Yumurtaların açık olan uygulama penceresi, parafilm yardımıyla hava almayacak şekilde kapatıldı. Yumurtalar tekrar 37 °C ve %75 nemli ortamda inkübasyon için, kuluçka makinesine kaldırıldı.

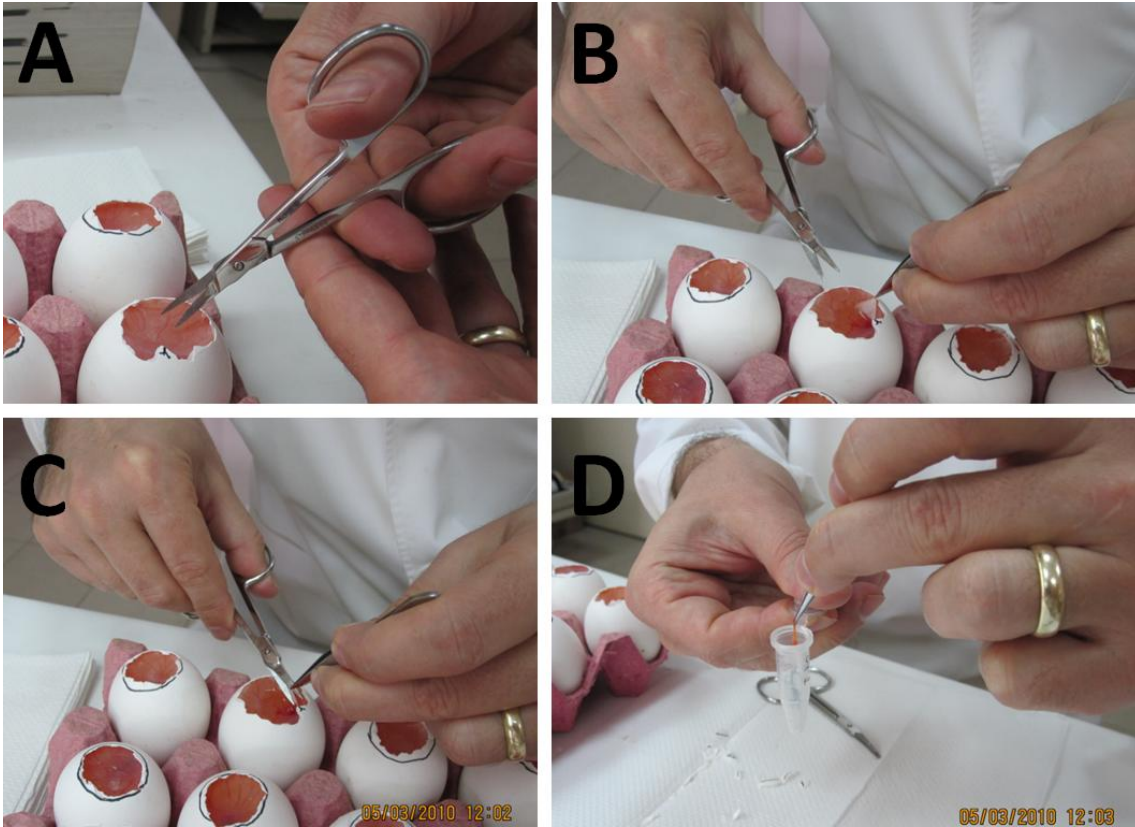


Şekil 3.3. CAM üzerinde damarlanmanın artarak devam ettiği uygun bölgeye, distile su içerisinde etken maddenin uygulanması (A,B) ve parafilm yardımıyla yumurtaların kapatılması (C).

3.4. Çalışmanın Sonlandırılması

Uygulama sonrasında kuluçka makinesinde inkübasyona kaldırılan yumurtalar, 48 saat sonra cihazdan çıkarıldı. Uygulama penceresinin üzerindeki

parafilm kaldırılarak, tüm yumurtaların son durumlarının fotoğrafları çekildi. Cerrahi makas yardımıyla, uygulama yapılan alandaki CAM dokusundan RT-PCR çalışması için örnekler alındı. Makroskobik değerlendirme sonrasında 1 ng/50 μ L dozajındaki uygulamanın etkisiz olduğu gözlemlendi. Bu nedenle bu gruptan örnek alınmadı. Kontrol grubundan beş adet ve 2 ng/50 μ L, 5 ng/50 μ L sVEGFR-1 uygulanan gruplardan anti-anjiyogenik etki gözlenen tüm yumurtalardan (sırasıyla 6 ve 7 adet) örnekler alındı. Alınan örnekler fosfatlı tamponla (PBS) yıkandıktan sonra eppendorf tüplere konuldu. Örnekler çalışma zamanına kadar -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.4. Çalışmanın sonlandırılma aşamasında, uygulama yapılan bölgeden CAM örneklerinin alınması.

3.5. Rölatif Gen Ekspresyon Düzeylerinin  l  m 

Toplanan  rneklerde RT-PCR yöntemiyle, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, HIF-1 'ya ait relatif gen ekspresyonu analizi yapıldı. Bu parametrelere ait verilerin hesaplanmasında internal kontrol geni olarak, Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) geninin ekspresyon seviyesi kullanıldı.

3.5.1. RNA  zolasyonu

Toplanan örneklerin oda sıcaklığına getirilerek     lmeleri sağlandı. RNA izolasyonu için High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanıldı.

- 1- Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 200  L PBS eklenerek süspanse hale gelmesi sağlandı.
- 2- Örneklerin  zerine 400  L Lysis Buffer (4,5 M Guanidin HCl, 50 mM Tris HCl, %30 Triton X-100 (w/v), pH: 6,6 (25  C)) eklendi. 10 mL'lik bir enjektör içerisine 25-30 defa çekilip bırakılarak dokunun homojenize olması sağlandı.   erisinde gözle görülebilen partiküller içeren, tam homojenize olmamış dokularda, örnek uygun hale gelinceye kadar enjektörle homojenizasyon işlemine devam edildi.
- 3- Homojenat süzme tüpüne alındı. Süzme tüpü bir toplama tüpünün içerisine konarak 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi ve homojenat filtreden geçirildi. Böylece homojenizasyonla açığa çıkan genetik materyallerin filtrede toplanması sağlandı.
- 4- Toplama tüpündeki sıvı kısım atıldı ve süzme tüpü tekrar ayrı bir toplama tüpünün içerisine yerleştirildi. Süzme tüpünün üzerine; 90  L DNase inkübasyon buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 10 mM MnCl₂, pH:7.0 (25  C)) ve 10  L DNase (10 KU liyofilize DNase + 0,55 mL Elüsyon Buffer) karışımı eklendi. Bu şekilde 15 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 5- Süzme tüpünün üzerine 500  L Wash Buffer-I (kullanmadan önce solüsyona 20 mL etanol eklenerek son hacimle ulaşılan konsantrasyonlar: 5 M

Guanidin HCl, 20 mM Tris-HCl, pH:6,6 (25 °C)) eklendi. 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.

- 6- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım atılarak süzme tüpünün üzerine 500 µL Wash Buffer-II (kullanmadan önce solüsyona 40 mL etanol eklenerek son hacimle ulaşılan konsantrasyonlar: 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH: 7,5 (25 °C)) eklendi. 8000 g'de 15 saniye santrifüj edildi.
- 7- Toplama tüpünde biriken sıvı kısım atılarak süzme tüpünün üzerine 200 µL Wash Buffer-II eklendi ve 13000 g'de iki dakika santrifüj edildi.
- 8- Süzme tüpü steril 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisine yerleştirildi. Üzerine 50 µL Elusyon Buffer (Nükleaz içermeyen, steril bidistile su) eklendi. Bu şekilde 8000 g'de bir dakika santrifüj edildi.
- 9- Süzme tüpü çıkartılıp atıldı. Böylece Homojenattaki toplam RNA havuzu, mikrosantrifüj tüpünde izole edilmiş oldu.
- 10-İzole edilen RNA örnekleri bir sonraki aşamaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

cDNA sentezlenme aşamasında Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanıldı.

- 1- Daha önce hazırlanmış olan RNA örnekleri oda ısısında bekletilerek çözüldü.
- 2- Kite ait tüm reaktifler oda ısısında bekletilerek çözüldü. Ardından 5000 g de 5 saniye kadar santrifüj edilerek tüplerdeki solüsyonların tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Daha sonra tüm reaktifler buz aküsü üzerine konuldu ve tüm çalışma boyunca buz aküsü üzerinde bulunduruldu.
- 3- RNA örneklerinin RNA/DNA oranını ve konsantrasyonlarını belirlemek için spektrofotometrik çalışma yapıldı. 10 µL RNA örneğinden alınarak 490 µL distile su içerisine konuldu. 260 ve 280 nm dalga boyunda Optik Dansiteleri

- (OD) okundu. OD_{260}/OD_{280} oranları $>1,6$ olan örnekler çalışma için uygun olarak kabul edildi.
- 4- Örneklerdeki RNA konsantrasyonu $OD_{260} \times 40 \times 50$ (dilüsyon faktörü) formülü ile hesaplandı.
- 5- Tüm örnekler, son konsantrasyonları $1 \mu\text{g}/12 \mu\text{L}$ olacak şekilde dilüe edildi.
- 6- Steril, nükleaz içermeyen, ince duvarlı bir PCR tüpü içerisine
- $2 \mu\text{L}$ dilüe edilmiş örnek,
 - $1 \mu\text{L}$ Anchored oligo $(dT)_{18}$ primer ($50 \mu\text{M}$)
 - $8,4 \mu\text{L}$ distile su
 - Toplam hacim $11,4 \mu\text{L}$ olacak şekilde hazırlandı.
- 7- Hazırlanan bu karışım Thermal Cycler cihazında, 65°C 'de 10 dakika inkübe edildi, daha sonra buz aküsü üzerinde soğutuldu.
- 8- Soğutulan karışımın üzerine;
- $4 \mu\text{L}$ Reverse Transcriptase Reaction Buffer (250 mM Tris-HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl_2 , $\text{pH} \sim 8,5$ (25°C))
 - $0,5 \mu\text{L}$ Protector RNase inhibitor (saklama tamponu: 20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 8 mM dithiothreitol, %50 giserol (v/v), $\text{pH} \sim 7,6$ (4°C))
 - $2 \mu\text{L}$ Deoxynucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP'nin her birisinden 10 mM)
 - $1 \mu\text{L}$ DTT ($0,1 \text{ M}$)
 - $1,1 \mu\text{L}$ Reverse Transcriptase (saklama tamponu 200 mM potasyum fosfat, 2 mM dithiothreitol, % $0,2$ Triton X-100 (v/v), % 50 gliserol (v/v), $\text{pH} \sim 7,2$)
 - Toplam hacim $8,6 \mu\text{L}$ daha eklenerek, tüp içerisindeki hacim $20 \mu\text{L}$ 'ye tamamlandı.
- 9- Hazırlanan karışım hafifçe karıştırıldı. 30 dakika 55°C 'de inkübe edildi.

10- Reverse Transkriptaz enziminin inhibisyonu için 85 °C'de 5 dakika daha inkübe edilerek işleme son verildi. Böylece cDNA sentezi tamamlanmış oldu.

3.5.3. Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Relatif Gen Ekspresyonu Düzeylerinin Belirlenmesi

cDNA sentez aşamasından sonra RT-PCR çalışmasına geçildi. Bu aşamada Lightcycler Taqman Master Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanıldı.

- 1- Hot start PCR reaksiyon karışımı (Taq DNA polimeraz, MgCl₂, reaksiyon buffer, dNTP mix karışımı), kit kullanım kılavuzunda tarif edildiği şekilde hazırlandı.
- 2- Primer + Hidroliz Prob karışımı (final konsantrasyon 0,5 µM primer + 0,25 µM prob olacak şekilde) hazırlandı.
- 3- Hazırlanan reaksiyon karışımı, örnek ve primer-prob karışımı kapiller tüplere konularak, LightCycler 2.0 cihazında RT-PCR yöntemiyle analiz aşamasına geçildi (4 µL reaksiyon karışımı + 5 µL cDNA örneği + 2 µL primer-prob karışımı + 9 µL PCR grade distile su; toplam 20 µL).
- 4- Preinkübasyon aşamasında 10 dakika 95 °C'de inkübe edildi.
- 5- Amplifikasyon aşamasında;
 - Denatürasyon 95 °C'de 10 saniye,
 - Annealing 60 °C'de 40 saniye,
 - Uzama aşamasında 72 °C'de 1 saniye, olacak şekilde bu döngü 45 defa tekrarlandı.
- 6- Soğutma aşamasında 40 °C'de 30 saniye bekletilerek RT-PCR analizi sonlandırıldı.
- 7- 530 nm dalga boyunda, floresans dedektörle elde edilen CT (Treshold Cycle) değerleri kullanılarak, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formülü ile (155), örneklerin, kontrol grubuna oranla rölatif gen ekspresyon düzeyleri hesaplandı.

3.6. İstatistiksel analizler: Elde edilen verilerin gösteriminde normal dağılıma bağlı olarak ortanca (Çeyreklikler arası sapma – Interquartile Range- IQR) değerleri kullanıldı. Araştırmacı tarafından dijital fotoğraf makinesi ile deneyden elde edilen görüntüler etkinlik durumuna göre 0 ile 3 arasında derecelendirildi. Etkinlik gözlenen yumurtalarda RT-PCR düzeyleri ölçüldü. Elde edilen RT-PCR değerlerinin (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, VEGF-A, HIF-1 α) ve etkinlik skorlarının deney grupları arasında farklılığının araştırılmasında Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi yöntemi uygulandı. Kruskal-Wallis analizi sonucunda ortaya çıkan farklılığın hangi deney grubundan kaynaklandığını belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmalar yapıldı. Bonferroni düzeltmesi; çoklu karşılaştırmalarda Tip I hata düzeyini kontrol altına alabilmek amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir. Bonferroni düzeltmesinin mantığında Tip I hata düzeyi (bu çalışma için $\alpha=0.05$) yapılacak ikili karşılaştırma sayısına bölünerek yeni bir kritik p değeri elde edilir. Örnek olarak etkinlik skorları için yapılacak Bonferroni düzeltmesi sonrasında;

$$\text{kritik hata (p) düzeyi} = \frac{0.05}{\text{ikili karşılaştırma sayısı}} = \frac{0.05}{6} = 0.0083 \text{ olarak belirlendi. İki}$$

grup arasındaki p değeri 0.008 ve altında ise anlamlı farklılıktan söz edildi. RT-PCR ölçüm skorlarının post-hoc karşılaştırılmasında ise kritik p değeri = 0.017 olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar için MS-Excel ve SPSS for Win. Ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları kullanıldı. Bonferroni düzeltmesi yapılmadığında $p \leq 0.05$ düzeyi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

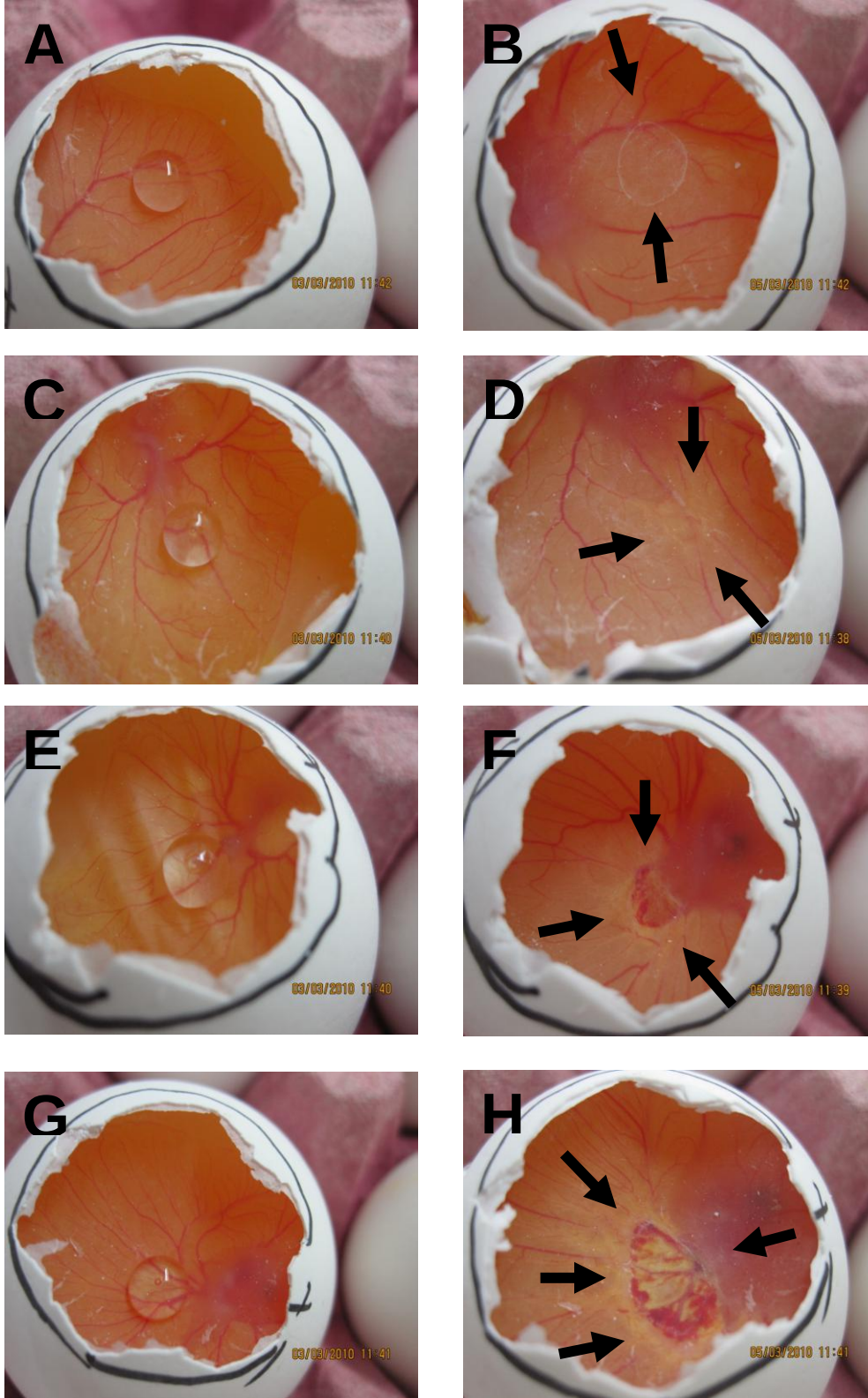
Uygulama sonrası, makroskopik olarak değerlendirme ve etkinlik skorlaması;

- Solüsyon damlatılan alandaki vasküler yapılarda, gözle görülebilen azalma varsa, bir pozitif etkinlik (+1),
- Solüsyon damlatılan alanda anjiyogenez tamamen durmuşsa, iki pozitif etkinlik (+2),
- Solüsyon damlatılan alanın dışına taşan anti-anjiyogenik bir etkinlik varsa, üç pozitif etkinlik şeklinde sınıflandırıldı (+3).

Makroskopik değerlendirme sonrasında, sVEGFR-1'in 1 ng/50 µL konsantrasyonunun CAM'da anti-anjiyogenik etkinliğinin olmadığı gözlemlendi. 2 ng/50 µL sVEGFR-1 uygulanan 8 yumurtanın iki tanesinde (%25) etkinlik gözlemlenmedi. Diğer yumurtalarda değişen derecelerde etkinlik gözlemlendi. 5ng/50µL sVEGFR-1 uygulanan grubun ise bir tanesi (%12,5) hariç, diğer tüm yumurtalarda değişen derecelerde etkinlik gözlemlendi. Gruplara ait uygulama etkinlik dereceleri tablo 4.1.de görülmektedir.

Tablo 4.1. Makroskopik değerlendirme sonrası gruplara göre uygulama etkinlik dereceleri

Grup	ETKİNLİK					TOPLAM
		Etkisiz	1 pozitif	2 pozitif	3 pozitif	
Kontrol	n	8	0	0	0	8
	%	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0
1 ng/50 µL	n	8	0	0	0	8
	%	100.0	0.0	0.0	0.0	100.0
2 ng/50 µL	n	2	1	3	2	8
	%	25.0	12.5	37.5	25.0	100.0
5 ng/50 µL	n	1	0	2	5	8
	%	12.5	0.0	25.0	62.5	100.0
TOPLAM	n	19	1	5	7	32
	%	59.4	3.1	15.6	21.9	100.0



Şekil 4.1. Uygulama öncesi ve sonrasında makroskobik değerlendirme örnekleri (A-B: etkisiz uygulama, C-D: bir pozitif, E-F: iki pozitif, G-H: üç pozitif etkinlik).

Yumurtalarda uygulama dozajına bağlı makroskobik değerlendirme etkinlik dereceleri incelendiğinde; uygulama dozajlarından en az birinin diğerlerine göre istatistiksel olarak farklı etkinliğe sahip olduğu gözlemlendi ($X^2=20.826$; $p<0.001$). Yapılan Bonferroni düzeltmeli ikili post-hoc Mann-Whitney karşılaştırma sonuçları Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Bonferroni düzeltmeli post-hoc ikili karşılaştırma sonuçları

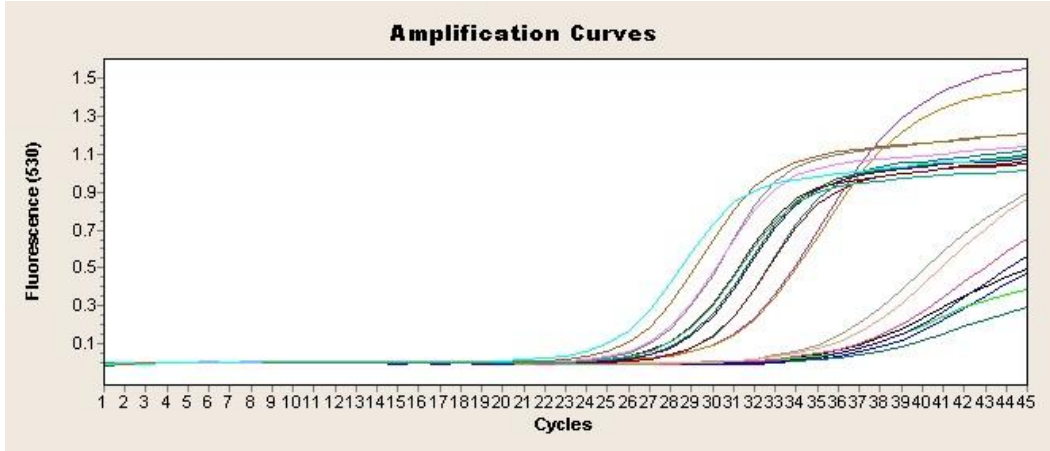
Uygulama Dozajı	Kontrol		1 ng/50µL		2 ng/50µL	
	Z	p	Z	p	Z	p
1 ng/50µL	0.000	1.000				
2 ng/50µL	2.910	0.010	2.910	0.010		
5 ng/50µL	3.303	0.002*	3.303	0.002*	1.453	0.195

*: İstatistiksel olarak anlamlı farklılık

Tablo 4.2. incelendiğinde; Kontrol grubu ile sadece yüksek dozaj (5ng/50µL) grupları arasında ($Z=3.303$; $p=0.002$) ve 1 ng/50µL ile yüksek dozaj grupları arasında ($Z=3.303$; $p=0.002$) istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmektedir. Diğer uygulama dozajları arasında ise etkinlik bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülememektedir. Uygulanan sVEGFR-1 ancak yüksek dozajlarda (5 ng/50µL) diğer dozajlarına göre daha etkilidir, diğer uygulama dozajlarındaki etkisi benzerdir.

Kontrol ve 1 ng/50µL gruplarında deneklerden hiçbirinde etkinlik gözlenemezken, 2 ng/50µL grubunda 6 denekte (% 75.0) en az bir pozitif etkinlik gözlenmiştir. 5 ng/50µL grubunda ise deneklerin sadece 1’inde (% 12.5) etkinlik gözlenemezken, iki denekte 2 pozitif ve deneklerin yarıdan fazlasında ($n=5$, %62.5) ise 3 pozitif etkinlik gözlenmiştir. Bu skorlara bakılarak en yüksek etkinliğin 5 ng/50µL grubunda gözlemlendiği söylenebilir.

Bu aşamadan sonra farklı uygulama gruplarındaki yumurtalardan alınan doku örneklerinde relatif gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için RT-PCR çalışmasına geçildi.



Şekil 4.2. RT-PCR çalışmasında amplifikasyon siklusu esnasında, floresans piki ile farklı genlerin CT değerlerinin belirlenmesi.

Kontrol ve 1 ng/50 μ L konsantrasyonlu sVEGFR-1 uygulanan gruplarda herhangi bir etkinlik gözlenmediği için, bu gruplardan 1 ng/50 μ L grubu RT-PCR çalışmasının dışında tutuldu. Kontrol grubu ise diğer iki grubun karşılaştırılabileceği referans değerlerini elde edebilmek adına RT-PCR çalışmasına dâhil edildi. 2 ng/50 μ L ve 5 ng/50 μ L gruplarında etkinlik göstermeyen yumurtalarda RT-PCR çalışmasına alınmadı. Kontrol grubundan ve 2 ng/50 μ L ve 5 ng/50 μ L sVEGFR-1 uygulanan (etkinlik gözlenen yumurtalardan) gruplardan alınan örneklerle yapılan RT-PCR çalışmasında; kontrol grubunun gen ekspresyonu seviyesi 1 kabul edilerek, bu değere oranla elde edilen diğer parametrelerin rölatif gen ekspresyonu düzeyleri Tablo 4.3'de görülmektedir.

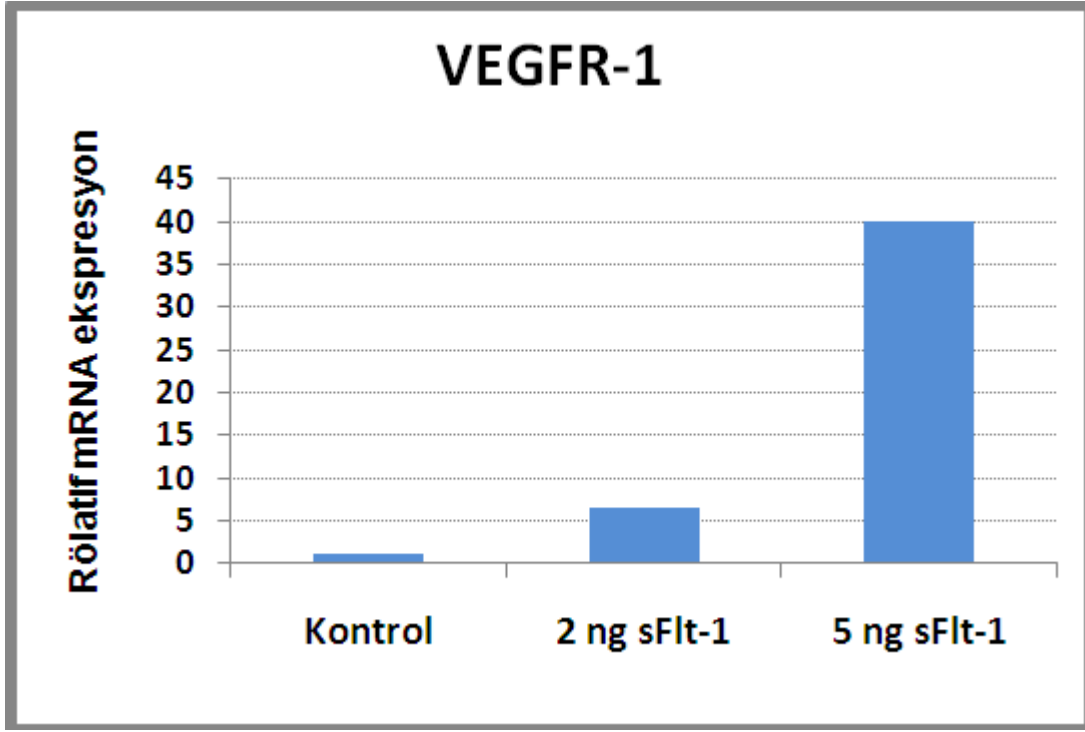
Tablo 4.3. Rölatif gen ekspresyon düzeyleri *

Grup	Reseptörler				
	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	VEGF-A	HIF-1 α
Kontrol	1.04 (0.96)	0.98 (0.14)	1.05 (1.11)	1.02 (0.56)	0.99 (0.25)
2 ng/50 μ L	6.57 (14.02)	2.60 (0.97)	23.10 (22.17)	2.64 (0.93)	1.95 (0.62)
5 ng/50 μ L	39.94 (47.93)	1.40 (0.34)	15.66 (29.86)	1.63 (0.45)	1.45 (0.96)
χ^2	10.122	13.898	10.847	11.827	8.580
p	0.006	0.001	0.004	0.003	0.014

*: Değerler Ortanca (IQR) şeklinde verilmiştir.

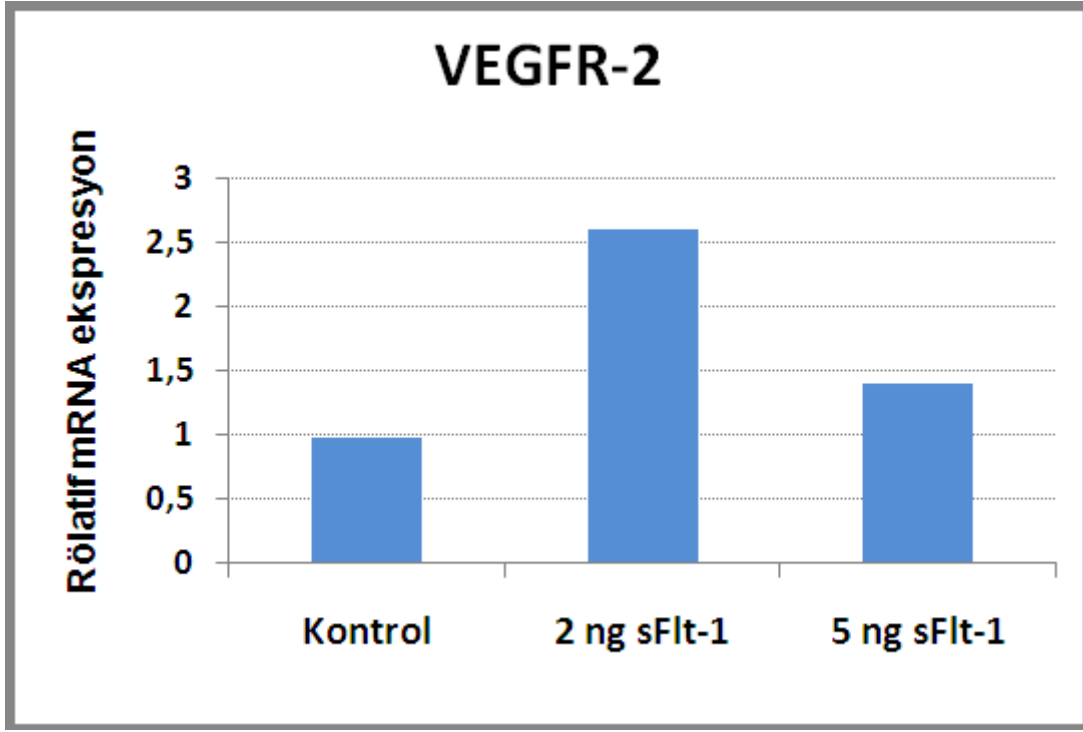
Tablo 4.3'e göre; tüm ölçüm parametrelerinde en az bir uygulama grubu diğerlerinden farklı ortancaya sahiptir.

VEGFR-1 parametresi için tablo incelendiğinde; Kontrol, 2 ng/50 μ L ve 5 ng/50 μ L gruplarından en az birinin ortancası diğerlerinden farklıdır. Farklı grubu bulabilmek amacı ile Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi ile ikili post-hoc karşılaştırmalar yapıldığında; Kontrol ile 2 ng/50 μ L ($Z=2.556$; $p=0.009$) ve Kontrol ile 5 ng/50 μ L ($Z=2.842$; $p=0.003$) grupları arasındaki farklılık anlamlı iken, 2 ng/50 μ L ile 5 ng/50 μ L grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($Z=1.429$; $p=0.181$). Yumurtalarda sVEGFR-1 uygulaması yapılmış olanlarla Kontrol grubu arasında farklılık varken, sVEGFR-1 uygulama dozajı (2 ya da 5 ng/50 μ L olması) VEGFR-1 gen ekspresyonu seviyeleri bakımından anlamlı farklılık oluşturmamaktadır. RT-PCR yöntemiyle rölatif gen ekspresyon seviyeleri ölçülen grupların VEGFR-1 düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.3'de görülmektedir.



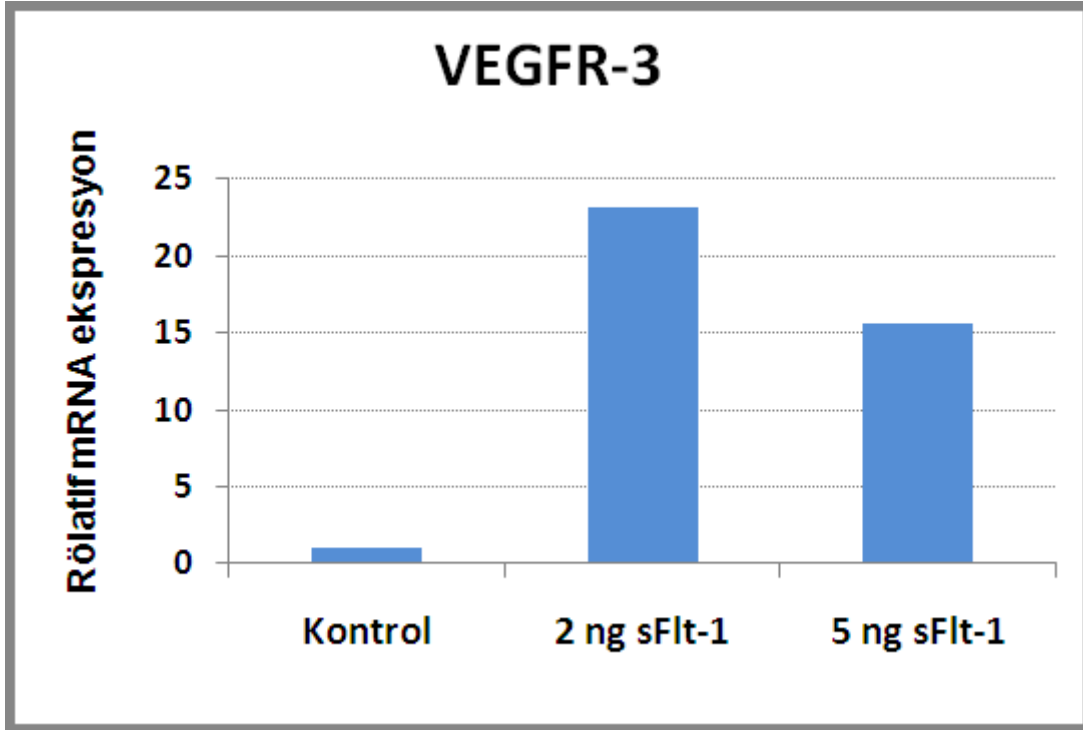
Şekil 4.3. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-1 mRNA ekspresyon düzeyleri

VEGFR-2 parametresi açısından tablo incelendiğinde; Kontrol, 2 ng/50 µL ve 5 ng/50 µL gruplarından en az birinin ortancası diğerlerinden farklıdır. Farklı grubu bulabilmek amacı ile yapılan ikili post-hoc karşılaştırmalar sonucunda; Kontrol ile 2 ng/50 µL ($Z=2.739$; $p=0.004$) ve 2 ng/50 µL ile 5 ng/50 µL ($Z=2.571$; $p=0.008$) grupları arasındaki farklılık anlamlı iken, Kontrol ile 5 ng/50 µL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($Z=2.030$; $p=0.048$). Yumurtalarda yüksek doz sVEGFR-1 uygulaması yapılmış olanlarla Kontrol grubu arasında farklılık yokken, orta düzey dozaj sVEGFR-1 uygulaması, uygulanmaması ya da yüksek doz uygulanmasına göre anlamlı farklılık oluşturmaktadır. Rölatif gen ekspresyon seviyeleri ölçülen grupların VEGFR-2 düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.4'de görülmektedir.



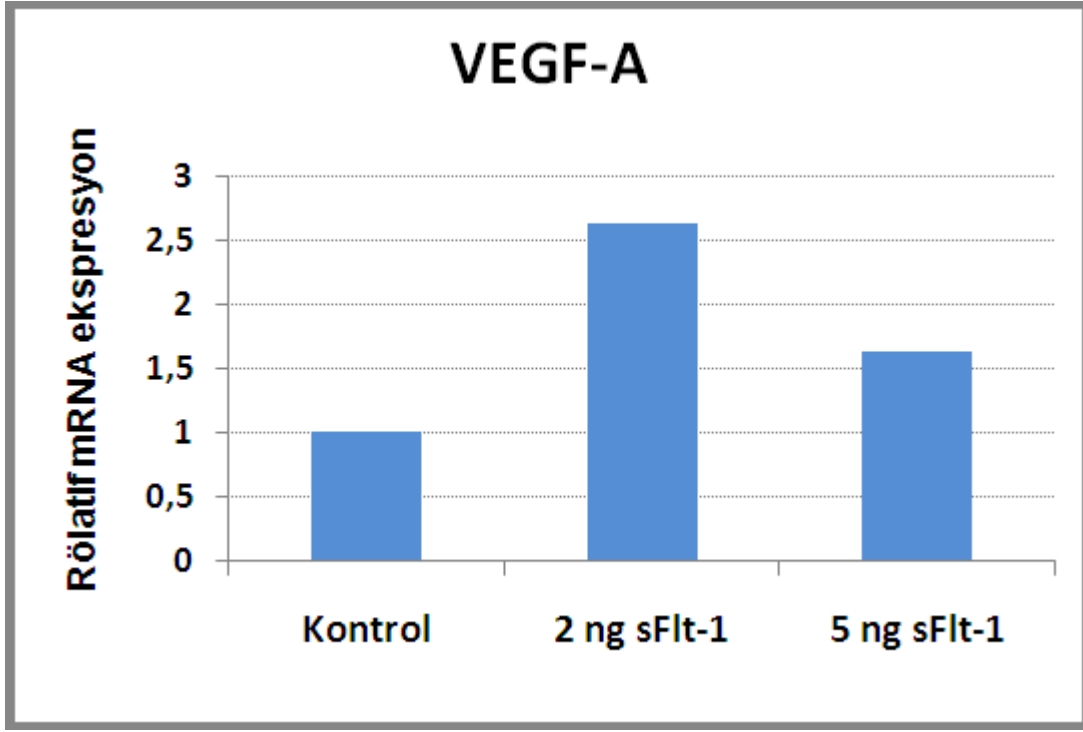
Şekil 4.4. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-2 mRNA ekspresyon düzeyleri

VEGFR-3 parametresi için bakıldığında; Kontrol, 2 ng/50 µL ve 5 ng/50 µL gruplarından en az birinin ortancası diğerlerinden farklıdır. Farklı grubu bulabilmek amacı ile ikili post-hoc karşılaştırmalar yapıldığında; Kontrol ile 2 ng/50 µL ($Z=2.556$; $p=0.009$) ve Kontrol ile 5 ng/50 µL ($Z=2.517$; $p=0.010$) grupları arasındaki farklılık anlamlı iken, 2 ng/50 µL ile 5 ng/50 µL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır ($Z=0.429$; $p=0.731$). Yumurtalarda sVEGFR-1 uygulaması yapılmış olanlarla Kontrol grubu arasında farklılık varken, sVEGFR-1 uygulama dozajı (2 ya da 5 ng/50 µL olması) anlamlı farklılık oluşturmamaktadır. RT-PCR çalışması ile rölatif gen ekspresyon seviyeleri ölçülen grupların VEGFR-3 düzeylerinin karşılaştırması Şekil 4.5’de görülmektedir.



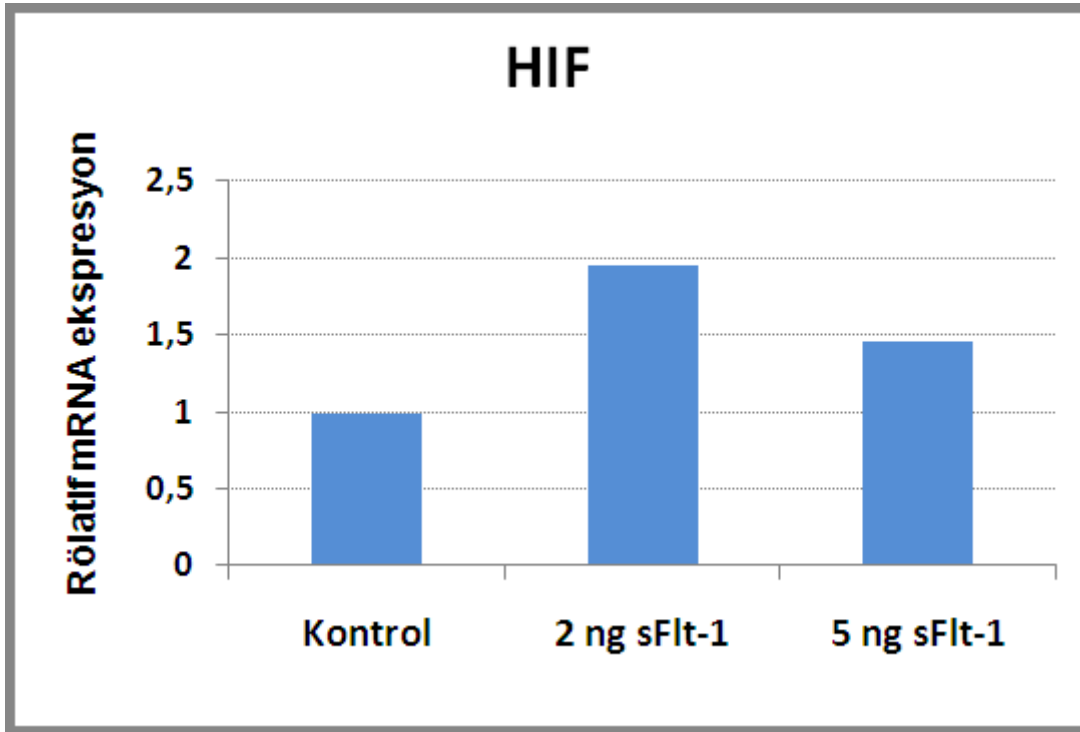
Şekil 4.5. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGFR-3 mRNA ekspresyon düzeyleri

VEGF-A parametresi için bakıldığında; Kontrol, 2 ng/50 µL ve 5 ng/50 µL gruplarından en az birinin ortancası diğerlerinden farklıdır. Farklı grubu bulabilmek amacı ile ikili post-hoc karşılaştırmalar yapıldığında; Kontrol ile 2 ng/50 µL ($Z=2.739$; $p=0.004$), 2 ng/50 µL ile 5 ng/50 µL ($Z=3.000$; $p=0.001$) grupları arasındaki farklılık anlamlı iken, Kontrol ile 5 ng/50 µL grupları arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı farklılık vardır ($Z=2.355$; $p=0.018$). Yumurtalarda yüksek doz sVEGFR-1 uygulaması yapılmış olanlarla Kontrol grubu arasında nerede ise farklılık yokken, yüksek dozaj sVEGFR-1 uygulaması, uygulanmaması ya da orta düzey doz uygulanmasına göre anlamlı farklılık oluşturmamaktadır. VEGF-A rölatif gen ekspresyon düzeylerinin ölçüm yapılan gruplarda karşılaştırması Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda VEGF-A mRNA ekspresyon düzeyleri

HIF-1 α parametresi açısından bakıldığında ise; Kontrol, 2 ng/50 μ L ve 5 ng/50 μ L gruplarından en az birinin ortancası diğerlerinden farklıdır. Farklı grubu bulabilmek amacı ile yapılan ikili post-hoc karşılaştırmalar sonucunda; Kontrol ile 2 ng/50 μ L ($Z=2.739$; $p=0.004$) grupları arasındaki farklılık anlamlı iken, Kontrol ile 5 ng/50 μ L grupları arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı farklılık vardır ($Z=2.355$; $p=0.018$). 2 ng/50 μ L ile 5 ng/50 μ L grupları arasındaki farklılık ise istatistiksel olarak önemsizdir ($Z=1.571$; $p=0.138$). Yumurtalarda yüksek doz sVEGFR-1 uygulaması yapılmış olanlarla Kontrol grubu arasında nerede ise farklılık yokken, orta düzey dozaj sVEGFR-1 uygulaması, uygulanmamasına göre farklılık oluşturmakta ancak yüksek doz uygulanmasına göre önemli farklılık oluşturmamaktadır. sVEGFR-1 uygulaması yapılması farklılık oluşması için yeterlidir, dozajın HIF-1 α üzerinde anlamlı etkisi yoktur. Yine bu parametre ile ilgili karşılaştırmalar Şekil 4.7’de görülmektedir.



Şekil 4.7. RT-PCR çalışması yapılan gruplarda HIF-1 α mRNA ekspresyon düzeyleri

5. TARTIŞMA

sVEGFR-1, Shibuya ve ark. tarafından 1990 yılında tanımlanan (93), kanda ve vücut sıvılarında çözülmüş halde bulunan bir VEGF reseptörüdür. Preeklampsili gebelerde, normal gebeliklere göre kandaki seviyelerinin daha fazla yükseldiği, pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (156). Gebe ratlara uygulandığında preeklampsinin major bulguları olan hipertansiyon ve proteinüri gelişimi gözlenmiştir (139). Bununla birlikte gebe olmayan ratlarda da kanda VEGF'ün % 50 oranında azalması, preeklampside görülene benzer şekilde proteinüri ve glomerüler endotelyozis tablosuna neden olmaktadır (157). Bu ve buna benzer klinik bulgular ışığında, sVEGFR-1'in preeklampsisi ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir. Ancak hipoksinin mi sVEGFR-1'i artırdığı yoksa sVEGFR-1'in mi anjiyogenezi inhibe ederek hipoksiye neden olduğu konusu tam olarak aydınlatılamamıştır (158).

sVEGFR-1'in önceleri, sadece hamile kadınların vücut sıvılarında bulunduğu ve plasenta tarafından sentezlendiği düşünülse de, cinsiyet farkı olmaksızın, sağlıklı insanların plazmasında da bulunduğu rapor edilmiştir (159). Anti-anjiyogenik etkisini iki şekilde oluşturduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi, VEGF'e yüksek affinite ile bağlanmakta ve böylece VEGF'ün inhibisyonuna neden olmaktadır. İkincisi hücre membranındaki VEGF reseptörlerine bağlanarak, heterodimerizasyona neden olmakta ve sinyal iletimini inhibe etmektedir.

sVEGFR-1 yalnızca memelilerde bulunmamaktadır. Yamaguchi ve ark. larının 2002 yılında yayınladıkları çalışmada; VEGF ve sVEGFR-1'in avian türlerinde de sentezlendiği ve memeli türleriyle homolojisini yüksek oranda koruduğu rapor edilmiştir (160). Dolayısıyla CAM modeli; VEGF, sVEGFR-1 gibi parametrelerle yapılacak anjiyogenezi çalışmaları için oldukça elverişli bir modeldir. Ancak CAM modelinde, sVEGFR-1'in anti-anjiyogenik etkinliğinin gösterildiği bir çalışma, henüz yapılmamıştır.

Uygulama sonrasında yapılan makroskobik değerlendirme skorlamasına ait sonuçlar Tablo 4.1'de gösterilmiştir. CAM modelinde yapılan uygulamalarda anti-anjiyogenik etkinlik değerlendirilirken; yapılan uygulamanın toksik veya lokal hasar

verici etkilerinin olup olmadığı da değerlendirilmelidir. Bizim yaptığımız çalışmada, CAM üzerinde sVEGFR-1 uygulaması yapılan alanda, sVEGFR-1'in doza bağımlı bir tarzda anjiyogenezi inhibe etmesi ile sonuçlanmıştır. Ancak bu anti-anjiyogenik etki, CAM üzerinde sadece uygulama yapılan alanla sınırlı kalmış, uygulama yapılan alanın dışındaki CAM bölgelerinde, ayrıca bir etki oluşturmamıştır. Uygulama yapılan tüm yumurtalarda, embryo canlılığını devam ettirerek gelişimini sürdürmüştür. Bu durum; sVEGFR-1'in toksik veya lokal hasar verici etkilerinin bulunmadığı, anti-anjiyogenik etkisini VEGF ile etkileşimi sonucunda oluşturduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Uygulama sonrası, makroskopik olarak değerlendirme ve etkinlik skorlamasında, sVEGFR-1'in etkinliğinin, konsantrasyonla birlikte arttığı görülmektedir. Skorlama tablosunda 2 ng/50µL dozaj uygulamasının makroskopik değerlendirmesinde, 8 yumurtanın 6 tanesinde (% 75) etki görülmüş, bunların 2 tanesinde ise (%25) en üst düzeyde (üç pozitif) etkinlik tespit edilmiştir. Dozaj 5 ng/50µL'ye çıktığında ise 8 yumurtanın 7 tanesinde (%87,5) etkinlik gözlenmiştir. Bunlarında 5 tanesinde (%62,5) etkinlik en üst (üç pozitif) düzeydedir. Bu verilerin istatistikî analizi sonucunda, makroskopik değerlendirme skorlarına göre 5 ng/50µL dozaj uygulanan grup diğer uygulama gruplarından anlamlı bir şekilde farklı bulunmuştur.

Fizyolojik koşullardaki hücreler hipoksiye maruz bırakıldıklarında, ilk metabolik tepki olarak hücre içinde HIF düzeyleri artmaktadır. Bu artışla birlikte aktive olan HIF-1α, DNA üzerindeki hipoksi ile indüklenen bölgelere bağlanarak, hipoksik travmaya karşı hücrel cevabı oluşturan 100 civarında genin ekspresyonunu arttırmaktadır. Anjiyogenezin inhibisyonu da, dokularda hipoksiye neden olan etmenlerden biridir. Bu nedenle, çalışmamızda sVEGFR-1 uygulanan gruplarda, HIF-1α ekspresyonunun, kontrol grubuna göre artmış olması beklenmektedir. Bu durumla uyumlu olarak sVEGFR-1 uygulanan her iki grupta da HIF-1α düzeyleri artmış olarak bulunmuştur. Ancak 2 ng/50µL dozaj uygulanan grupta HIF-1α geninin ekspresyon düzeylerinin, 5 ng/50µL dozaj uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta yapılan uygulamanın

etkinliđi makroskobik olarak deđerlendirildiđinde, sVEGFR-1'in yůksek konsantrasyonlarının, anjiyogenezi daha etkin bir řekilde inhibe ettiđi anlařılmaktadır. Makroskobik deđerlendirmede daha etkili olduđu gůrůlen bu grubun HIF-1 α důzeylerinin, 2ng/50 μ L dozaj grubundan daha důřůk olarak bulunması; yůksek dozajların doku důzeyinde anjiyogenezi çok yůksek oranda inhibe ettiđi ve vaskůlarizasyonun yetersizliđi, dolařım bozukluđu, ileri důzeyde hipoksiye maruz kalma gibi nedenlerle, hůcrelerin apopitotik sůrece girdiđi řeklinde yorumlanmıřtır. Hůcre kůltůrůnde yapılan benzer çalıřmalarda, hipoksiye maruz bırakılan endotel hůcrelerinin, orta důzeyde hipoksi ile (% 5 Oksijen), VEGF, HIF ve diđer anjiyogenik molekůllerin sentezinin arttıđı, ancak ađır hipoksik kořullarda endotel hůcrelerinin apopitotik sůrece girdiđini rapor eden pek çok çalıřma bulunmaktadır (161). Literatůrde, CAM modelinde HIF gen ekspresyon důzeylerini ۆlen, sınırlı sayıda çalıřma bulunmaktadır.

Organizmada anjiyogenezi, pek çok anjiyogenik faktůr ve bunların reseptůrleri tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Ancak anjiyogenezi için en ۆnemli důzenleyici molekůl VEGF'důr. Gen důzeyinde yapılan çalıřmalarda, VEGF'ůn, anjiyogenezin esas důzenleyicisi olduđu yůnůnde kanıtlara ulařılmıřtır. ۆrneđin, VEGF kodlayan genin bir allelinin inaktive edilmesi, vaskůler yapı ve fonksiyon bozukluklarına bađlı olarak embryonik dۆnemde ۆlůmlle sonuçlanmaktadır (162). Bu nedenle hůcre içi VEGF důzeyleri, embryonik geliřim dۆneminde hayati ۆneme sahiptir.

Hipoksi, VEGF mRNA důzeylerinin artmasında en ۆnemli faktůrlerden birisidir. Ancak, hipoksi VEGF (VEGF-B, VEGF-C, vb.) ailesinin diđer ۆyelerini aynı řekilde etkilememektedir. Bu nedenle VEGF'ůn (VEGF-A), hipoksi ile indůklenmiř anjiyogenik cevabın en ۆnemli mediatůrů olduđu důřůnůlmektedir. Ayrıca VEGF mRNA'sının sentezlendiđi bۆlgenin hemen ۆn tarafında, Hipoksi responsif element adı verilen, hipoksi ile indůklenebilir faktůr I (HIF-1) için bir bađlanma bۆlgesi bulunmaktadır. Bu sayede, hipoksik kořullarda HIF-1 důzeylerinin artmasıyla, HRE'lerin aktivasyonu ve VEGF sentezi artmaktadır (31,163). Yaptıđımız gen ekspresyon důzeyi çalıřmasında, VEGF mRNA ekspresyonlarının, orta důzey

dozaj (2 ng/50 µL) uygulanan grupta, yüksek dozaja göre daha fazla oranda yükseldiği görülmüştür. Sonuçların istatistiksel incelemesinde de orta düzey dozaj uygulaması, kontrol ve yüksek dozaj grubundan anlamlı bir şekilde farklı bulunmuştur. Ancak doz artımı ile birlikte bu farklılık azalmış ve böylece yüksek dozaj ve kontrol grubu arasında sınırda anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Bu sonuç HIF ekspresyon düzeyleri ile paralellik göstermektedir. HIF ekspresyonuna benzer şekilde, VEGF ekspresyonunun da yüksek dozaj grubunda azalması, hücrelerin apoptotik sürece girdikleri şeklinde yorumlanmıştır (161). Literatürde farklı hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda, hipoksinin VEGF mRNA ekspresyonunu artırdığı rapor edilen yayınlar mevcuttur, ancak CAM modelinde VEGF mRNA ekspresyon düzeyinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

VEGF reseptörlerinden VEGFR-1, embryonik dönemde vaskülogenez aşamasında esansiyeldir. VEGFR-1 defektif fareler, embryonik dönemde ortalama 8,5. günde ölmektedir. Bu farelerde endotel hücrelerinin normal bir şekilde proliferasyonu olduğu, ancak bu hücrelerin organize olarak vasküler yapıları oluşturamadığı rapor edilmiştir (94-96). Hiratsuka ve ark.'nın 1998 yılında yayımladığı bir çalışmada ise, embryonik dönemde VEGFR-1'in sadece tirozin kinaz domain gen bölgesi knock-out edilen farelerin canlılığını sürdürdüğü ve normal olarak doğdukları rapor edilmiştir (95). Bu sonuç, embryonik dönemde VEGFR-1'in, esas olarak hücre dışındaki kompartmanının, anjiyogenezde düzenleyici rol oynadığını düşündürmektedir.

Embryonik dönemin dışında ise VEGFR-1'in, anjiyogenezin temel hücresel aktiviteleri olan endotel hücre proliferasyonu veya migrasyonu gibi olaylara katkısı, net bir şekilde gösterilememiştir. Bununla birlikte VEGFR-1'in uyarılmasının, endotel hücrelerinde uPA, PAI-1 ve doku faktörünün ekspresyonunu artırdığı ve anjiyogenik sürece bu şekilde katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (97,98). Ancak genel kanı, VEGF'e olan affinitesi VEGFR-2'den yaklaşık on kat kadar daha yüksek olduğu halde, VEGFR-1'in tuzak reseptör olarak görev aldığı ve VEGF'e bağlanarak anjiyogenezin kontrollü bir şekilde devam etmesinde yardımcı olduğu yönündedir (164).

Yaptığımız çalışmada ekspresyon düzeylerini ölçtüğümüz bir diğer parametre de VEGFR-1'dir. VEGFR-1 mRNA ekspresyon düzeyleri, sVEGFR-1 uygulama dozajı ile birlikte artmaktadır. Diğer ölçümü yapılan parametrelerle mukayese edildiğinde, çalışmamızda ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre en fazla artan parametre VEGFR-1'dir. Bu bulgu, esas olarak embriyonik dönemde görev yapan VEGFR-1'in, bu dönemde anjiyogenez için oldukça önemli bir düzenleyici olduğunu düşündürmektedir. VEGFR-1 düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesinde, kontrol grubu ile uygulama yapılan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yani sVEGFR-1 uygulaması, VEGFR-1 ekspresyon düzeyleri açısından net bir şekilde farklılık oluşturmaktadır. Ancak uygulama dozajı farklı olan grupların karşılaştırma sonucu, istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. Daha geniş bir örneklem alınarak yapılacak çalışmaların, sVEGFR-1 dozajının VEGFR-1 ekspresyon düzeylerine etkisini daha net olarak ortaya koyabilecek aydınlatıcı bilgiler verebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda VEGFR-2 gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi, 2 ng/50 µL uygulanan grupta diğer iki gruptan farklı iken, kontrol ve 5 ng/50 µL gruplarında farksız bulunmuştur. VEGFR-2 düzeyleri de HIF ve VEGF'e benzer şekilde, 2 ng/50 µL grubunda kontrol grubuna göre yükselmiş, ancak daha sonra dozajın artışı ile birlikte tekrar azalarak kontrol grubuna yaklaşmıştır. Ribatti ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, VEGF'ün CAM üzerinde koryonik epitel hücrelerinde sentezlendiği, VEGFR-2'nin ise vasküler endotel hücre yüzeyinde bulunduğu rapor edilmiştir (165). Bu nedenle VEGF'ün sentezlendikten sonra, endotel hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunu arttırarak anjiyogenik süreci başlattığı düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada da, anjiyogenez için esas düzenleyici reseptör olan VEGFR-2'nin ekspresyon düzeylerinin VEGFR-1 kadar yükselmemesi, VEGF'ün soluble reseptörü tarafından sekestre edilmesi ve bu nedenle endotel hücrelerinin VEGFR-2 sentezlemek üzere uyarılmasının aksaması ile açıklanabilir. Bununla birlikte VEGFR-2 ekspresyon düzeylerinin sınırlı artışında etkisi olabilecek bir diğer konu da; çalışmamızda CAM üzerinde uygulamanın yapıldığı günün, inkübasyonun altıncı günü olmasıdır. Uygulama esnasında

vasküler yapıların tüp formasyonu oluşmuş ve primitif dolaşım sistemi, çalışmaya başlamış olmaktadır. Bu dönemde kalp atımlarında dışarıdan gözle görülebilecek seviyeye gelmiştir. Dolayısıyla ilkel vasküler yapıların alt yapısı ve büyük damarlar kısmen oluşmuştur. VEGFR-2, endotel hücrelerinin temel anjiyogenik cevaplarının oluşmasına aracılık eden, esas reseptördür. Yani endotel hücre proliferasyonu, migrasyon ve anti-apoptotik etkilerin oluşmasından sorumludur. Tüm bu aşamalarda VEGFR-2'nin anjiyogenik süreç içerisinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir. Bu nedenlerle; inkübasyonun daha önceki dönemlerinde (örneğin 3. veya 4. gün) yapılacak sVEGFR-1 uygulamasının, VEGFR-2 reseptör ekspresyon seviyelerinde daha belirgin bir artışa neden olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda VEGFR-3 düzeylerinin uygulama yapılan gruplarda belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Ancak dozaj farklılığı, uygulama yapılan gruplar arasında ekspresyon düzeyi açısından istatistiksel olarak bir farklılık oluşturmamıştır. Lenfatik damarlar, arter ve arterioller arasında bağlantı sağlamaktadır, ancak esas olarak venler, özellikle de büyük venöz yapıların etrafında bir ağ oluşturmaktadırlar. Dolayısıyla venöz yapılarla oldukça sıkı bir ilişki içerisinde olduklarıdır. Lenfanjiyogenezden VEGFR-3 reseptörünün sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu reseptörün ligandı ise esas olarak VEGF-C'dir (166). Çalışmamızda CAM üzerine sVEGFR-1 uygulaması yapılmıştır, ancak günümüzde sVEGFR-1'in VEGF-C ile etkileşime girdiği ve onun sekestrasyonuna neden olduğu yönünde bir bilgi bulunmamaktadır. sVEGFR-1 uygulamasının VEGFR-3 ekspresyon düzeylerini arttırmasının, venöz yapıların oluşumundaki inhibisyonla ilişkili olarak, lenfatik sistemin gelişiminde ortaya çıkabilecek aksaklıklara bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Literatürde CAM üzerinde yapılmış, VEGFR-3 ekspresyon düzeylerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

CAM modeli üzerinde sVEGFR-1 uygulanarak yapılan bu çalışmada, sVEGFR-1'in anjiyogenezi inhibe ettiği, makroskopik olarak net bir şekilde gözlenmiştir. Daha sonrasında RT-PCR yöntemiyle gen ekspresyon düzeyleri incelenen VEGF reseptörleri, VEGF ve HIF'in, kontrol grubuna göre mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edilmiştir. Bu bulgular da, makroskopik olarak değerlendirilen sonuçların, moleküler düzeyde ne tür etkilere neden olduğu konusunda aydınlatıcı bilgiler vermektedir.

Anjiyogenez pek çok patolojik sürecin içerisinde yer almaktadır. Bu nedenle günümüzde pro-anjiyogenik veya anti-anjiyogenik tedavi yaklaşımları, bilinen tedavi modaliteleri içerisinde giderek önemli bir yer edinmektedir. Bunun başlıca örnekleri, kanser tedavisinde kullanıma giren anti-anjiyogenik preparatlardır. Ancak bu yaklaşımlar sadece kanser hastalıkları tedavisi ile sınırlı değildir. Kronik yara tedavilerinde, anjiyogenik süreci destekleyen bazı pansuman materyallerinin kullanımı ile ilgili bilgiler literatüre girmiş olup, bunların örnekleri günden güne artmaktadır. Anti-anjiyogenik yaklaşımın etkili olduğu düşünülen başka bir konu kontrasepsiyondur. Bu yaklaşımla lokal olarak kullanılacak anti-anjiyogenik preparatlarının, günümüzde halen kullanılan hormon bazlı preparatlara, yan etkileri bakımından üstünlük sağlayacağı düşünülmektedir. Bunların dışında psöriazis, diyabetik retinopati gibi pek çok patolojik durum, anjiyogenezle yakından ilişkilidir.

Çalışmamızda kullandığımız sVEGFR-1, organizmada fizyolojik olarak bulunan bir moleküldür. Bu molekülün anti-anjiyogenik etki gösterdiği, çalışmamızda net bir şekilde anlaşılmaktadır. Bu molekülün doğrudan kendisi veya moleküler olarak modifiye edilmiş formlarının, anti-anjiyogenik yaklaşımlar için uygun bir aracı molekül olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1- Asahara T, Murohara T, Sullivan A ve ark. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997; 275: 964–67.
- 2- Shi Q, Rafii S, Wu MH ve ark. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. Blood 1998; 92: 362–67
- 3- Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. APMIS 2004; 112:402-412.
- 4- Norrby K. In-vivo models of angiogenesis. J Cell Mol Med 2006; 10: 588-612.
- 5- Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. Contrib Embryol 1935;25:39-81
- 6- Coman DR, Sheldon WF. The significance of hyperemia around tumor implants. Am J Pathol 1946;22:821-831
- 7- .Algire GH, Chalkely HW, Legallais FY, Park H. Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo: I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. JNCI 1945;6:73-85
- 8- Ide AG, Bake NH, Warren SL. Vaskularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. Am J Roentgenol 1939;42:891-899
- 9- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med 1971;285:1182-1186
- 10- Folkman J. The vaskularisation of tumors. Sci Am 1976;234:58-73.
- 11- Folkman J. Angiogenesis. In: Biology of endothelial cells. Ed. EA Jaffe. Boston: Nijhoff, 1984, pp 412-428
- 12- Kalebic T, Gabrisa S, Glaser B, Liotta LA. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science 1983;221:281-283.

- 13-** Moscatelli D, Gross JL, Rifkin DB. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells (Abstract). *J Cell Biol* 1981;91:201a.
- 14-** Nagy JA, Brown LF, Senger DR, Lanir R, Van De Water L, Dvorak AM et al . Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta* 1989;948:305-326
- 15-** Paulus W, Grothe C, Sensenbrenner M, Janet T, Bauer I, Graf M, et al. Lokalization of basic fibroblast growth factor, a mitogen and angiogenic factor, in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 1990;79:418-423.
- 16-** Schulze-Osthoff K, Risau W, Volmer E, Sorg C. In situ detection of basic growth factor by highly spesific antibodies. *Am J pathol* 1990;137:85-92.
- 17-** Folkman J. Tumor angiogenesis. In *The Molecular Basis of cancer*. Edited by Mendelsohn, PM Howley, MA Israel, LA Liotta. Philadelphia: Saunders, 995, pp 206-232.
- 18-** Connoly DT. Vascular permeabilty factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 1991;47:219-223.
- 19-** Dvork HF, Sioussat TM, Brown LF, et al. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991;174:1275-1278.
- 20-** Ferrera N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family proteins. *Endocr Rev* 1992;13:18-32
- 21-** Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrum M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of BFGF in the multistep development of fibtosarcoma. *Cell* 1991;66:1095-104.
- 22-** Kim KJ, Li B, Winer J. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis supresses tumor growth in-vivo. *Nature* 1993;362:841-4

- 23-** Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- 24-** O'Reilly MS, Holmgren L, Chen CC, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996;2:689-92.
- 25-** O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin. *Cell* 1997;88:277-85.
- 26-** Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor associated macrophages. *Lab Invest* 1984;51:635-42.
- 27-** Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990;82:4-6.
- 28-** Allure R. Basement membranes: Structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 422- 433
- 29-** Haroon ZA, Peters KG, Greenberg CS ve ark. İçinde Teicher BA, editör. Angiogenesis and Oxygen Transport in Solid Tumors. *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. Totowa, Humana Press; 1999. 3- 21.
- 30-** Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2002; 35: 227-231.
- 31-** Dibbens JA, Miller DL, Damert A ve ark. Hypoxic regulations of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation multiple RNA elements. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 907-19.
- 32-** Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669–76
- 33-** Dvorak HF. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003;162: 1747–57
- 34-** Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ ve ark. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-309.

- 35-** Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. Clin Dermatol 1994; 12: 157- 169.
- 36-** Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. Stem Cells 2003; 21: 118–119. **34-** Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. Eur J Cancer 1996; 32: 2423–2429
- 37-** Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular of angiogenesis. Intern Rev Immunol 2002;21:33-49
- 38-** Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. Biochem Pharmacol 2001;61:253-270
- 39-** Clement B, Musso O, Lietard J, Theret N. Homeostatic control of angiogenesis: A newly identified function of the liver? Hepatology 1999;29:621-623.
- 40-** Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. Int J Biochem Cell Biol 2001;33:357-369
- 41-** Mignatti P, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. EnzymeProtein 1996; 49: 117- 137
- 42-** Das SK, Vasudevan DM. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. Life Sci 2007;81:1555-1564
- 43-** Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res 1977; 14: 53–65
- 44-** Davis GE, Saunders WB. Molecular balance of capillary tube formation versus regression in wound repair: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. J Invest Dermatol Symp Proc 2006;11(1):44-56
- 45-** Davis GE, Senger DR. Endothelial Extracellular Matrix: Biosynthesis, Remodeling, and Functions During Vascular Morphogenesis and Neovessel Stabilization. Circ Res 2005;97:1093-1107

- 46-** Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: A paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein*. 1996; 49: 138–162
- 47-** Longo R, Sarmiento R, Fanelli M ve ark. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002;5:237-56
- 48-** Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 2004;19:176-182
- 49-** Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacol Rev* 2004;56:549-580
- 50-** Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol* 2005;6(2)209
- 51-** Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies therapeutic implications. *Blood* 2005;105:1383-95
- 52-** Nakayama K. Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J Biochem* 2009;146(6):757-65
- 53-** Iliopoulos o, Kibel A, Gray S, ve ark. Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gen product. *Nat Med* 1995;1:822-26
- 54-** Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, ve ark. The tumour supressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-75
- 55-** Cockman ME, Masson N, Mole DR, ve ark. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor supressor protein. *J Biol Chem* 2000;275:25733-41
- 56-** Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, ve ark. Binding of the von Hippel-Lindau tumor supressor protein to elongin B and C. *Science* 1995;269:1444-46

- 57-** Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, ve ark. Negative regulation of hypoxia inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10595-99
- 58-** Lonergan KM, Iliopoulos O, Ohh M, ve ark. Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor supressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 1998;18:732-41
- 59-** Sharp FR, Bernaudin M. HIF-1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5:437-448
- 60-** Ferrara N, Davis-Symth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25
- 61-** Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994;71:374-79
- 62-** Ohta Y, Watanabe Y. Current Concept of Angiogenesis Related to Primary Lung Cancer. In: Pass IH (ed). *Lung Cancer*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins, 2000;199-210
- 63-** Quinn TP, Soifer SJ, Ramer K, Williams LT, Nakamura MC. A receptor for vascular endothelial growth factor that stimulates apoptosis. *Cancer Res* 2001;61:8629-37
- 64-** Davidson AJ, Zon LI. Biomedicine, Love, honor and protect (your liver). *Science* 2003;299:835-37
- 65-** Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparinbinding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-82
- 66-** Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004;117:3-32

- 67-** Varet J, Douglas SK, Gilmatrin L, Medford AR, Bates DO, Harper SJ, Millar AB. VEGF in the lung: a role for novel isoforms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;298(6):768-74
- 68-** Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB J* 1999;13:10-22
- 69-** Giatromanolaki A. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2001;21:4373-82
- 70-** Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a forth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14
- 71-** Qui Y, Hoareau-Aveilla C, Oltean S, Harper SJ, Bates DO. The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. *Biochem Soc Trans* 2009;37(6):1207-13
- 72-** Jonca F, Ortega N, Gleizes PE, Bertrand N, Poulet J. Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1997;272:24203-9
- 73-** Detmar M. Tumor angiogenesis. *JID symposium proceedings*; 2000;5:20-23
- 74-** Ortega N, Lfaqihi FE, Poulet J. Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell* 1998;90:381-90
- 75-** Zhang F, Tang Z, Hou X, Lennartsson J, Li Y, Koch AW, Scotney P, Lee C, Arjunan P, Dong L, Kumar A, Rissanen TT, Wang B, Nagai N, Fons P, Fariss R, Zhang Y, Wawrousek E, Tansey G, Raber J, Fong GH, Ding H, Greenberg DA, Becker KG, Herbert JM, Nash A, Yla-Herttuala S, Cao Y, Watts RJ, Li X. VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(15):6152-57

- 76-** Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24(10):1146-52
- 77-** Clauss M. Molecular biology of the VEGF and VEGF receptor family. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:561-9
- 78-** Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA. *ve ark*. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (VEGFB) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000;86:29-35
- 79-** Achen MG, Stacker SA. The VEGF family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int Exp Path* 1998;79:255-65
- 80-** Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and plasental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7:575-83
- 81-** Homsí J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* 2007;14:285-294
- 82-** Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:587-593
- 83-** Klagsbrun M, D'Amore P. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259-70
- 84-** Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the

induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189:824-31

85- Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor and insulinlike growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1994;145:1023-9

86- Pekala P, Marlow M, Heuvelman D, Connolly D. Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J Biol Chem* 1990;265:18051-4.

87- Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nature Med* 1996;2:992-7.

88- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: A tumor derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172:1535-45

89- Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, et al. Myeloid progenitor cells regulatory effects of vascular endothelial growth factor. *Int J Hematol* 1995;62:203-15

90- Pajusola KAO, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. FLT4 receptor tyrosine kinase contain seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res* 1992;52:5738-43

91- Jakeman LB, Winer J, Benneth GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-53

92- Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 2001;188:359-68

- 93-** Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane M, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression by of a novel human reseptor type tyrosine kinase gene closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-24
- 94-** Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganisation, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 1999;126:3015-25
- 95-** Hiratsuka S, Minova O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the thyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9349-54
- 96-** Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breirman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70
- 97-** Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(20):11709-14
- 98-** Ferrara N, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611
- 99-** Terman BI, Dougher Vermazen M, Maglione D, Lassam NJ, Gasporadowicz D, Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase a reseptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-86
- 100-** Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995;376:62-66
- 101-** Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.

- 102-** Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-8
- 103-** Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7533–37
- 104-** Millauer B, Wizigmann Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835–846
- 105-** Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-6
- 106-** Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205 (1):728-38
- 107-** Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, Waxham MN. Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: Identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240(3):635-39
- 108-** Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001;20(11):2768-78
- 109-** Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, Claesson-Welsh L. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO J* 2005;24(13):2342-53
- 110-** Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M. The adaptor protein Shb binds to tyrosine 1175 in

vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF dependent cellular migration. *J Biol Chem* 2004;279(21): 22267-75.

111- Warner AJ, Lopez-Dee J, Knight EL, Feramisco JR, Prigent SA. The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vacular endothelial growth factor receptor KDR in transfected cells. *Biochem J* 2000;347:501-9

112- Lamalice L, Houle F, Huot J. Phosphorilation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem* 2006;281(45):34009-20.

113- Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999;18(13):2221-30

114- Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, King GL. Charecterization of vascular endothelial growt factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J. Clin. Invest.* 1996;98(9):2018-26.

115- Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C., Luft FC, Haller H. The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(1):178-85

116- Holmqvist K, Cross M, Riley D, Welsh M. The Shb adaptor protein causes Src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cell Signal* 2003;15(2):171–79.

117- Parsons JT. Focal adhesion kinase. The first ten years. *J Cell Sci* 2003;116:1409-16

118- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70(3):401–10.

- 119-** Dance M, Montagner A, Yart A, Masri B, Audigier Y, Perret B, Salles JP, Raynal P. The adaptor protein Bab-1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2006;281(32):23285-95.
- 120-** Laramee M, Chabot C, Cloutier M, Stenne R, Holgado-Madruga M, Wong AJ, Royal I. The scaffolding adapter Gab 1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J Biol Chem* 2007;282(11):7758-69
- 121-** Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002;296(5573):1655-57
- 122-** Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998;282(5392):1318-21.
- 123-** Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999;96(6):857-68
- 124-** Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273(21):13313-16
- 125-** Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic protein survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264(3):781-88
- 126-** Dvorak HF. Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor: A Critical Cytokine in Tumor Angiogenesis and a Potential Target for Diagnosis and Therapy. *J Clin Oncol* 2002;20(21):4368-80.

- 127-** Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factor. *J Anat* 2002;200(6):581-97
- 128-** Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):2604-09
- 129-** Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399(6736):601-05
- 130-** Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399(6736):597-601
- 131-** Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 1997;420(1):28–32
- 132-** Glikli G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* 2001;353(3):503-12
- 133-** Soker S, Takashimo S, Miamo H. Neurophilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45
- 134-** Wolfgang J. Pitfalls in the measurement of circulating vascular endothelial growth factor. *Clin Chem* 2001;47:617-23

- 135-** Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:10705-09
- 136-** Toi M, Bando H, Ogawa T, Muta M, HornigC, Weich HA. Significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)/soluble VEGF receptor-1 relationship in breast cancer. *Int J Cancer* 2002;98:14-8
- 137-** Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, ReuschP,Klisch J, Augustin HG et al. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:99-110
- 138-** Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *New Engl J Med* 2004;350:672-83
- 139-** Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649-58
- 140-** Barleon B, Totzke F, Herzog C. ve ark. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellölar domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem* 1997;272:10382-88
- 141-** Tanaka K, Yamaguchi S, Sawano A, Shibuya M. Characterization of the extracellular domain in vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1 tyrosine kinase). *Jpn J Cancer Res* 1997;88:867-76
- 142-** Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G. ve ark. Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis and mortality rate. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:8795-800

- 143-** Lin P, Sankar S, Shan S. ve ark. Inhihition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor. *Cell Growth Differ* 1998;9:49-58
- 144-** Hornig C, Herbert AW. Soluble VEGF receptors: Recombinant and naturally occuring forms involved in the regulation of angiogenesis. *Angiogenesis* 1999;3:33-39
- 145-** Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS. A naturally occuring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in Mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004;2(6):315-26
- 146-** Albuquerque RJC, Hayashi T, Cho WG, Kleinman ME, Dridi S, Takeda A, Baffi JZ. ve ark. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* 2009;15:1023-30
- 147-** Muller AM, Hermanns MI, Cronen C, Kirkpatrick CJ. Comparative study of adhesion molecule expressionin cultured human macro and micro vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2002;73:171-80
- 148-** Zetter BR. Endothelial heterogeneity: influence of vessel size, organ localization and species specificity on the properties of cultured endothelial cells. *Endotehelial Cells* 1988;2:64-79
- 149-** Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmac Ther* 1991;51:1-11
- 150-** Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncall L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in-vivo. *Anat Rec* 2001;264:317-24
- 151-** Özgürtaş T. Anjiyogeneizde bir in-vivo model: civciv koryoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi* 2009;51:67-69

- 152-** Özgürtaş T, Aydın İ, Tapan S, Avcı Ö, Erbil MK. Bilberry inhibits angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. *Biofactors* 2008;33:161-64
- 153-** Grasset N, Raffoul W, Bigliardi P. Bioactive dressings. *Rev Med Suisse* 2010;6(236):354-57
- 154-** Richter GT, Bowen T, Boerma M, Fan CY, Hauer-Jensen M, Vural E. Impact of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in irradiated rats. *Arch Facial Plast Surg* 2009;2:110-13
- 155-** Livak JK, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using quantitative Real-Time PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 2001;25(4):402-8
- 156-** Mutter PW, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.* 2008;75(1):1–8
- 157-** Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003;111:707–16
- 158-** Karumanchi SA, Bdelah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the “Chicken-and-Egg” question. *Endocrinology* 2004;145:4835-37
- 159-** Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, Marme D. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 2001;4:143-54
- 160-** Yamaguchi S, Iwata K, Shibuya M. Soluble Flt-1 (soluble VEGFR-1), a potent natural antiangiogenic molecule in mammals, is phylogenetically conserved in avians. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291(3):554-9.
- 161-** Fong GH. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med.* 2009;87:549-60

- 162-** Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-39
- 163-** Takagi H, King G, Robinson G, Ferrara N, Aillo LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal preicytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:21676
- 164-** Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1) a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 2006;9:225-30
- 165-** Ribatti D, Cruz A, Nico B, Favier J, Vacca A, Corsi P, Roncalli L, Dammacco F. In situ hybridization and immunogold localization of vascular endothelial growth factor receptor-2 on the pericytes of the chick chorioallantoic membrane. *Cytokine* 2002;17(5):262-65
- 166-** Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997;188(1):96-10

