

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

PREMATURE RETİNOPATİSİ OLAN HASTALARDA KDR GEN
POLİMORFİZM TARAMASI VE BAZI HÜCRE YÜZEY
RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON DÜZEYİ

Hazırlayan
Sevil ÖZSOY

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2018
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PREMATURE RETİNOPATİSİ OLAN HASTALARDA KDR GEN
POLİMORFİZM TARAMASI VE BAZI HÜCRE YÜZEY
RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON DÜZEYİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Sevil ÖZSOY**

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2017-7276 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığım ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Sevil ÖZSOY

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Premature Retinopatisi Olan Hastalarda KDR Gen Polimorfizm Taraması Ve Bazı Hücre Yüzey Reseptörlerin Ekspresyon Düzeyi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

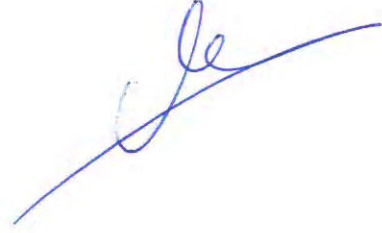
Tezi Hazırlayan

Sevil ÖZSOY



Danışman

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER



KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER danışmanlığında **Sevil ÖZSOY** tarafından hazırlanan “**Premature Retinopatisi Olan Hastalarda KDR Gen Polimorfizm Taraması Ve Bazı Hücre Yüzey Reseptörlerin Ekspresyon Düzeyi**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İmmünoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

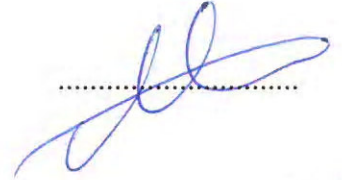
...../...../.....

JÜRİ

İmza

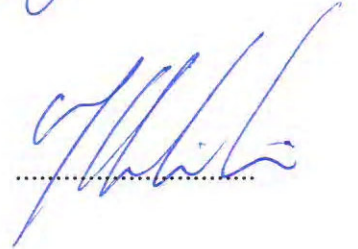
Danışman : Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

(İmmünoloji Anabilim Dalı)

.....


Üye : Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ

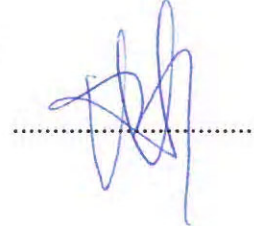
(Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı)

.....


Üye : Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Nisari

(Nuh Naci Yazgan Üniversitesi Sağlık Bilimleri

Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü)

.....


ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin ve tez çalışmalarım sırasında bana her konuda destek vererek bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım aynı zamanda danışmanlığımı yapan, İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER hocama teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım da hasta örneklerine erişimimde destekleri ve önerileri için Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Çağatay KARACA'ya teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda yer alan ve bana destek olan ablam, Dr. Nazlı Sultan ÖZSOY'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevil ÖZSOY

Kayseri, Temmuz 2018

**PREMATURE RETİNOPATİSİ OLAN HASTALARDA KDR GEN
POLİMORFİZM TARAMASI VE BAZI HÜCRE YÜZEY RESEPTÖRLERİN
EKSPRESYON DÜZEYİ**

Sevil ÖZSOY

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2018

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

KISA ÖZET

Amaç: Prematüre retinopatisi (ROP) gelişen bebeklerde KDR-gene ekspresyonunun, KDR- gen polimorfizminin taranması ve ROP hastalarının akım sitometri ile tanısında kullanılabilecek hücre yüzey belirteçleri araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmamız 35-38 hafta aralığındaki doğan prematüre bebeklerden alınan 1cc periferik kan örneği ile yürütüldü. Hasta grubu, Erciyes Üniversitesi Göz Hastalıkları ABD prematüre retinopatisi (ROP) polikliniğinde takip edilen hastalardan ve kontrol grubu ise pediatri ABD yenidoğan servisinde izlenen bebeklerden oluştu. İlk olarak akım sitometri analizi ile immatür monositler ve endotelial kök hücrelerin sayımı ve karakterizasyonu yapıldı. DNA ve RNA izolasyonu sonrası, KDR- gene polimorfizm ve KDR gen ekspresyon analizi real time PCR yöntemi ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Akım sitometrik analiz sonucunda immatür monositlerin göstergesi olan CD116⁺ ekspresyon eden hücre sayısının hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulundu (medyan H: 56,0, medyan K: 49,5)(*p*: 0,860). Endotelial kök hücre markırı olan CD146⁺ hücre sayısı ROP hastalarında kontrol grubuna göre daha fazla bulundu (medyan H: 88,0, medyan K: 85,0)(*p*: 0,791). KDR gen polimorfizm taramasında en sık görülen p.cys482arg polimorfizmine hasta ve kontrollerde rastlanmadı. KDR gen ekspresyonu çalışmasında ise ROP hasta grubunda 11 hastadan 7'sinde KDR gen ekspresyonunun artmış olduğu ve kontrol grubunda ise 8 kişiden 3'ünde KDR gen ekspresyonunda artışı olduğu gözlemlendi.

Sonuç: KDR gen ekspresyonunun ROP şüphesi olan premature bebeklerde rutin analizinin yapılması, ROP hastalarının daha erken fark edilmesine, erken tanı ve tedavi fırsatlarına erişmeye ve görme kaybı oluşumunu önlemeye katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: VEGF, Endotelyal progenitor hücre, Prematüre retinopatisi; ROP, KDR-geni



**THE SCREENING OF KDR GENE POLYMORPHISM AND THE
EXPRESSION LEVEL OF THE RESEPTORS OF CELL SURFACE IN
PATIENT WITH RETINOPATHY OF PREMATURITY**

Sevil ÖZSOY

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Immunology

Master of Science Thesis, August 2018

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ABSTRACT

Purpose: Screening of KDR-gene expression, CRP polymorphism and detection of cell surface markers that can be used in ROP patients by flow cytometry were aimed in infants with premature rheumatoid arthritis (ROP).

Method: Our study was conducted with 1cc peripheral blood sample taken from premature infants born between 35-38 weeks. The patient group consisted of the patients followed in Erciyes University Ophthalmology Department premature retinopathy (ROP) outpatient clinic and the control group consisted of the infants who were followed in the pediatric US newborn service. Initially, immortal monocytic cells and endothelial stem cells were counted and characterized by flow cytometry analysis. After isolation of DNA and RNA, expression of the KDR gene polymorphism and expression of the KDR gene was performed by real time PCR method.

Results: Flow cytometric analysis revealed that the number of CD116⁺ expressing cells, which are indicative of immature monocytes, was higher in the patient group than in the control group (median H: 56,0, median K: 49,5) (p : 0,860). The number of CD146⁺ cells, an endothelial stem cell marker, was found to be higher in ROP patients than in the control group (median H: 88.0, median K: 85.0) (p : 0,791). The most frequent p.cys482arg polymorphism in the screening of the KDR gene polymorphism was not found in the patients and controls. In the study of KDR gene expression, it was observed that the expression of KDR gene was increased in 7 of 11 patients in ROP group and in KDR gene expression in 3 of 8 in control group.

Conclusion: Routine analysis of KDR gene expression in premature infants with ROP suspicion was thought to be helpful in identifying ROP patients more easily, accessing early diagnosis and treatment opportunities, and preventing visual loss.

Key Words: VEGF, Endothelial progenitor cell, Retinopathy of Prematurity, ROP, KDR gene



İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
ONAY	iv
TEŞEKKÜR	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Prematür Retinopatisinin Tarihçe.....	2
2.2. Epidemiyolojisi.....	3
2.3. Risk Faktörleri	4
2.3.1. Gebelik yaşı ve düşük doğum ağırlığı	5
2.3.2. Oksijen tedavisi ve süresi:	5
2.3.3. Hipokarbi-Hiperkarbi:	6
2.3.4. Genetik faktörler:	6
2.3.5. Diğer risk faktörleri:	6
2.4. Patofizyolojisi.....	7
2.4.1. Embriogenez	7
2.4.2. Normal Retina Damar Gelişimi.....	7
2.4.3. Patogeneizde Etkili Temel Faktörler	9
2.4.3.1. VEGF Tarihçesi	9
2.4.3.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	10
2.4.3.3. VEGF Familyası ve Reseptörleri.....	10
2.4.3.4. VEGF-A İzofomlarının Üretimi.....	11
2.4.3.5. VEGF-A Ligand / Reseptör Bağlama.....	14
2.4.3.6. VEGFR-2 Sinyali	14

2.4.3.7. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör -2 (VEGFR-2 'KDR').....	17
2.5. ROP Hastalarının Klinik Özellikleri.....	19
2.5.1. Yerleşim Alanı	20
2.5.2. Hastalığın Vasküler Gelişim Evresi	21
2.6. ROP Tedavi Uygulamaları.....	22
2.6.1. Anti- VEGF Tedavisi.....	22
2.7. Monositer Progenitör Hücreler.....	22
2.8. Yeni Doğan ve ROP Hastalarında Monositer Progenitör Hücreler.....	24
2.8.1. Monositer Progenitör Hücrelerin Akım Sitometri ile Tanımlanması.....	24
2.8.1. Kullanılan Antikorlar ve Bağlandığı Bölgelerin Özellikleri.....	25
2.9. Moleküler Analiz Yöntemleri	27
2.9.1. Real time PCR.....	27
2.9.2. Gen Polimorfizm Belirleme Yöntemi.....	30
2.9.3. Gen Ekspresyonu Yöntemi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Alet ve Cihazlar	31
3.1.1. Kitler ve Kimyasal Maddeler	32
3.2 Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları.....	33
3.2.1. Monositer Progenitör Hücrelerin Akım Sitometri ile Tanımlanması.....	33
3.2.1.1. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları ...	33
3.2.2. Hasta Örnekleri ve Kontrollerde İmmatür Monosit Sayısının Akım Sitometri ile Hesaplanması.....	34
3.2.2.1. İmmatür Monosit/Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Hesaplanması.....	34
3.3. Polimorfizm Çalışması.....	35
3.3.1. DNA izolasyonu	35
3.3.2. Real-Time-PCR kiti ile KDR Gen Polimorfizmi Analizi.....	36
3.4. Hasta ve Kontrol Örneklerinde Ekspresyon Çalışması.....	39
3.4.1. Gen Ekspresyon Çalışması İşlem Basamakları.....	39
3.4.2. Elde Edilen Total RNA Saflığının Ölçülmesi.....	40

3.4.3. qRT-PCR ile KDR Gen Ekspresyonu ölçümü	41
3.5. Verilerin Analizi	44
4. BULGULAR	45
4.1. Uygulanan Testlerin Optimizasyonu	45
4.1.1. Akım sitometrik çalışmaların optimizasyonu	45
4.1.2. Gen ekspresyon ve mutasyon çalışmalarının optimizasyonu	45
4.2. Çalışmada Kontrol Grubu	45
4.2.1 Çalışmadaki ROP Hasta Grubu	46
4.3. Akım sitometri İle Monositer/ Endotelyal Progenitör Hücrelerin Analizi ..	48
4.3.1. Kontrol Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları	48
4.3.2. Hasta Örneklerinde Akım Sitometrik Analiz Sonuçları	49
4.3.3. Hasta ve Kontrol Grubunda İmmatür Hücrelerin Medyan Değerlerinin Karşılaştırılması	52
4.4. ROP Hastaları ve Kontrollerin Akım Sitometrik Analizde Elde Edilen Hücre Sayılarının Karşılaştırılması	55
4.5. KDR Gen Polimorfizm Taranması Sonuçları	58
4.5.1. Hasta ve Kontrol Hrubunda KDR Gen Polimorfizmi Taranması Sonuçları	59
4.6. KDR Geninin Hasta ve Kontrollerde Ekspresyon Analizi Sonuçları	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	67

EKLER

ÖZ GEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

PR	: Prematüre Retinopatisi
ROP	: Prematür Retinopatisi
VEGF	: Vasculer Endotelyal Büyüme Faktörü
Anti-VCEF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü İnhibitörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü
DA	: Doğum Ağırlığı
GY	: Gestasyonel Yaş
VEGFR-2	: Kinase İnsert Domain-Containing Receptor; KDR.
EPH	: Endotelyal Progenitör Hücreleri
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ERK	: Ekstrasellular Sinyal- Bağlantılı Kinaz
FAK	: Fokal Adhesyon Kinaz
GPCR G	: Protein-Coupled Receptor
HMVECs	: İnsan Mikrovasküler Endotelyal Hücreler
MAPK	: Aktive Olan Mitojen Protein Kinazlar
NFAT	: Aktive Olan T Hücrelerin Nükleer Faktörü
NRP1	: Neuropilin-1
PI3K	: Fosfotidlinositol 3-Kinase
PLC	: Fosfolipaz C
RTK	: Tirozin Kinaz Reseptörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ACTB	: B- Aktin Kontrol Geni
KDR	: Kinase İnsert Alan Reseptörü

TABLOLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.3. ROP gelişiminde başlıca risk faktörleri.....	5
Tablo 2.4. KDR geni kimlik bilgileri.....	18
Tablo 3.3.2. Polimorfizm analizi için master PCR karışımı	38
Tablo 3.3.2.1. Polimorfizm analizi için PCR ısı döngüleri ve süreler.....	40
Tablo 3.4. RNA izolasyonu kimyasal madde içerikleri.....	41
Tablo 3.4.3. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı.....	43
Tablo 3.4.3.1. Revers transkripsiyon karışımı ve bileşenleri.....	44
Tablo 3.4.3.2. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü.....	44
Tablo 3.4.3.3. Ekspresyon analizi için prob master PCR karışımı	45
Tablo 3.4.3.4. Ekspresyon analizi için ayarlanan sıcaklık ve süreler.....	46
Tablo 4.2. Kontrollerin doğum haftası, doğum kilosu ve cinsiyet durumu.....	48
Tablo 4.2.1. ROP Hastaların doğum haftası, doğum kilosu, cinsiyeti durumu	49
Tablo 4.3.1 Kontrol grubunda akım sitometri analiz sonuçları ve hücre sayıları.....	51
Tablo 4.3.2. Hasta grubunda akım sitometri analiz sonuçları ve hücre sayıları.....	52
Tablo 4.3.3. İmmatür monositer hücre sayılarının karşılaştırması	54
Tablo 4.5.1. Hasta ve kontrollerdeki KDR gen p.cys482arg polimorfizm sonuçları.....	61
Tablo 4.6. Hasta grubunda KDR gen ekspresyonu sonuçları.....	62
Tablo 4.6.1. Kontrol grubunda KDR gen ekspresyonu sonuçları.....	63
Tablo 4.6.2. Hasta ve kontrollerde KDR gen ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması.....	63

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa no

Şekil 2.4.2. Göz anatomisinin ve prematüre retinopatinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4.3.3. VEGF ailesi ve Reseptörleri.....	12
Şekil 2.4.3.4. VEGF-A İzofomlarının Yapısının Şematik Gösterimi.....	14
Şekil 2.4.3.6. VGEF-A'nın Aracılık Ettiği VGEFR-2 Sinyal Trasdüksiyon ve Değişim Yolları.....	16
Şekil 2.4.3.7. <i>KDR</i> (VEGFR-2) geni üç boyutlu yapısı ve genomik lokasyonu.....	19
Şekil 2.5.1. ROP Yerleşimi ve Yaygınlığı.....	21
Şekil 2.7. İnsanlarda monosit gelişiminin şematize görünümü.....	25
Şekil 2.7.1. İnsan dendritik hücre (DC) hematopoezisin şematik görünümü.....	25
Şekil 2.8. Akım sitometri genel çalışma prensibi.....	27
Şekil 2.9.1. Real Time PCR amplifikasyon eğrisi ve fazlar.....	31
Şekil 4.3.1. Kontrol grubunda K1 nolu kontrolün akım sitometrik kapılama ile monositer/ endotelyal progenitör hücre sayılarının gösterimi.....	50
Şekil 4.3.2. Hasta grubunda H1 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile monositer/ endotelyal progenitör hücre sayılarının gösterimi	52
Şekil 4.3.3. ROP hastalarının akım sitometri ile yapılan CD31 ⁺ , CD116 ⁺ ,CD146 ⁺ hücre sayılarının hastalara göre dağılımı.....	53
Şekil 4.3.4. Kontrol grubunun akım sitometri ile yapılan CD31 ⁺ , CD116 ⁺ , CD146 ⁺ hücre sayılarının kontrollere göre dağılımı	53
Şekil 4.3.5. CD34 ⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği.....	55

Şekil 4.3.6. CD31 ⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği.....	55
Şekil 4.3.7. CD38 ⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği.....	56
Şekil 4.3.8. CD116 ⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği.....	56
Şekil 4.3.9. CD146 ⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği.....	57
Şekil 4.4. ROP hasta grubundaki H1 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile CD34 ⁺ , CD31 ⁺ , CD38 ⁺ , CD116 ⁺ , CD146 ⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü.....	58
Şekil 4.4.1. Kontrol grubundaki K1 nolu kontrolün akım sitometrik kapılama ile CD34 ⁺ , CD31 ⁺ , CD38 ⁺ , CD116 ⁺ , CD146 ⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü.....	59
Şekil 4.5. KDR gen polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki sıcaklık ve pik eğrileri ile taranmasının gösterimi.....	60
Şekil 4.6. KDR geni mRNA ekspresyonunun hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırması.....	64
Şekil 4.6.1. KDR gen ekspresyonunun hasta ve kontrol grubundaki amplifikasyon eğrileri	64
Şekil 4.6.2. Hasta ve kontrollerdeki KDR gen ekspresyonunun karşılaştırmalı artış sonuç grafiği	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prematüre retinopatisi (ROP) çocukluk dönemi körlük nedenlerinde ilk sıralarda yer alan önemli bir hastalıktır. Prematüre retinopatisi, iskemiye bağlı proliferatif retinopatiye yol açabilen, retinal gelişimin erken tutulması ile karakterizedir (1). ROP, retina damar gelişimi sürecinde prematür doğuma sekonder durması sonucu gelişen iskemik, proliferatif retinopatik bir hastalıktır. Retinal vaskülarizasyonun durmasıyla da avasküler retina alanlarındaki iskemiye sekonder vasküler retina ile avasküler retinanın birleştiği yerde yeni damar gelişimi (neovaskülarizasyon) oluşur (2). Bu süreç, karmaşık bir anjiyogenik sitokinler ağı, hücre dışı matris bileşenleri ve büyüme faktörleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (3). Preterm doğumlarda artışla birlikte, ROP dünya çapında çocukluk körlüğünün önde gelen nedenlerinden biri haline gelmiştir (4). Preterm yenidoğanlarda vaskülarize olmamış immatür retinal sahaların göreceli olarak kanlanma eksiği sonucu ortaya çıkan ve ilerlemesi halinde körlüğe sebep olan anormal olarak çoğalan retinal damarlanma bozukluğudur.

Sağlık hizmetleri ve teknolojisindeki gelişmeye bağlı olarak yeni doğan servisleri ve yoğun bakım ünitelerindeki düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşatılabilmesi mümkün olmaktadır. Dolayısıyla prematüre bebeklerinde rastlanan, ROP günümüzde göz sağlığı açısından daha dikkat çekici bir sorun olarak öne çıkmıştır (5). ROP tanımlanmasında ve farkına varılmasında önemli zorluklar vardır. Dolayısıyla ROP için özgün olabilecek yeni laboratuvar parametrelerinin araştırılması ve hastalık tanısında kullanılabilmesi tanısal destek yönünden büyük katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı prematüre bebeklerde, KDR gen polimorfizmi ve KDR gen ekspresyonunun ölçülmesidir. Ayrıca hasta ve kontrol grubunda ROP ile ilişkili olabilecek bazı hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile ölçülerek hastalık sürecine etkileri araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Prematür Retinopatisinin Tarihçe

Prematüre retinopatisi (ROP) ilk olarak 1940'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde retrolental fibroplazi tanısı konduğunda, hayvan modellerinde doğumda yüksek oksijenin neden olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (6). 1942 yılında Terry tarafından persiste hyaloid arter ve lens damar sisteminin 'fibroplastik aşırı çoğalması' olarak tanımlanmıştır. Sekiz prematüre olguda lens arkasında opak kitle gözlemlenmiş ve bununla birlikte hastalığı 'retrolental fibroplazi' olarak tanımlamıştır (7). Hastalığın sadece geç ve skatrisyel dönemini tanımlayan bu adlandırma hastalığın patofizyolojisi daha iyi anlaşılmasına başlanınca bırakılmıştır. O dönemde nedene yönelik bilinen gerçek, yenidoğan bakımındaki gelişmeler ve yaşamları kurtarılan prematüre bebeklerde daha sık görülmesi şeklinde bildirilmiştir. Bunun dışında birçok risk faktörü (ışık, enfeksiyon, anemi, anoksi, demir eksikliği vb.) üzerinde araştırmalar yapılmış ve daha çok destekleyici oksijen tedavisi suçlu görülmüştür (8). Yenidoğanlarda oksijen desteğinin etiyolojide etken olduğu ilk kez 1951 yılında Campbell tarafından öne sürülmüş ve 1940 - 1950 yılları arasında kontrolsüz oksijen desteği verilen prematüre infantlar arasında "1. Epidemiy" dönemi yaşanmıştır. Araştırmacılar yüksek konsantrasyondaki oksijenin immatür retina hasar oluşturarak neovaskülarizasyona ve görme kaybına sebep olduğunu ortaya çıkarmışlardır (9,10,11,12). 1950'lerde destekleyici oksijen tedavisinin bu etkisinin belirlenmesi ile yenidoğan ünitelerindeki sınırsız oksijen uygulaması kısıtlanmıştır. Ancak, PR insidansında belirgin bir azalma görülmesine rağmen, yetersiz oksijen kullanımı sonucunda ölümlerde ve serebral palsy gibi nörolojik hastalıkların sıklığında artış olduğu bildirilmiştir (13). Bu nedenle 1960-1970 yılları arasında kullanılan oksijen dozu azaltılarak retinopati sıklığında bir azalma yaşanmış ve bu durum "1. Sessiz periyot" olarak adlandırılmıştır (14,15,16,17,18). 1960'lı yılların sonunda çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yüksek yaşam şartı oluşturabilme nedeni ile yüksek

konsantrasyonda oksijen kullanımına tekrar başlanılmıştır. 1970’li yılların başında oksijen monitörizasyonunun umbilikal arter kan gazı ile takip edilebilme avantajı olmasına rağmen ‘‘2. Epidemi’’ nin önüne geçilemediği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra yapılan bir çalışmada arter kan gazındaki oksijen düzeylerinin ve düzey dalgalanmalarının retinopati gelişimi ile ilişkili olmadığı, sürekli oksijen monitarizasyonun belirli aralıklarla monitarizasyona göre üstünlüğünün olmadığı saptanmıştır (19). Yenidoğan bakımındaki gelişmeler ve oksijeni düzenleme kabiliyeti ile, aynı çalışmadaki oksijen kullanım süresi düşük doğum ağırlığı ve doğum haftası ile retinopati gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğu da bildirilmiştir (19). ROP daha küçük ve genç preterm bebekler doğdukça yeniden ortaya çıkmıştır. Oksijenasyondaki dalgalanmalar da ciddi ROP ile ilişkili bulunmuştur (20). Oksijenasyondaki dalgalanmaların yanı sıra, insan ROP riskleri, zayıf bebek büyümesi (21) ve artmış oksidatif stres ile ilişkilendirmeyi içermektedir (22). Ayrıca 2000’li yıllarda ise anti-VEGF ajanların kullanılmasıyla hastalığın progresyonunun durdurulması yolunda belirgin bir şekilde ilerleme gözlenmiştir (23). Günümüzde doğum sonrası erken dönemde yoğun oksijen tedavisinin retinopati gelişmesi riskini arttırdığı 50 yıldır gösterilen birçok çalışmada de henüz hedef oksijen değerleri ile ilgili görüş birliği sağlanamamıştır. Amerikan pediatri akademisi 32 haftadan önceki dönemde bebekler için satürasyon değerlerini 85-95 % olarak, 32 hafta ve sonrası dönem bebekler için ise 85-93 % olarak belirlemiştir (24). Minghua ve Chen bir meta analiz çalışmasında 32 haftaya kadar olan ilk postnatal haftalar için satürasyon değerinin %70-96 aralığında 32 hafta ve sonrası için ise %94-99 aralığında olmasının ağır retinopati gelişim riskini anlamlı şekilde azalttığını ortaya koymuşlardır (25). Hastalığın risk faktörlerinin belirlenmesine, tedavisine ve patolojisine yönelik çalışmalar hala devam etmektedir.

2.2. Epidemiyolojisi

Akut fazdaki ROP aşamasıyla ilgili bilgiler temel olarak çok merkezli ‘‘Cryotherapy for ROP (CRYO-ROP)’’ çalışmasından gelmektedir. 1250 gramın altında doğmuş 4099 yenidoğanın incelendiği bu çalışmada katılımcıların %65,8 ’inde ROP tespit edilmiştir (26,27). Daha yakın zamanda yapılan büyük bir klinik çalışmada ‘‘Early Treatment of ROP Trial’’ 1250 gramın altında doğan 7000’e yakın bebek taranmıştır. Araştırmacılar 15 yıl önce yapılan CRYO-ROP çalışmasına benzer şekilde hastalığın yaklaşık olarak her üç bebekten ikisinde görüldüğünü tespit etmişlerdir. Hastalık zamanlaması ve

progresyon oranlarında çok az değişiklik olduğu tespit edilse de ETROP hasta popülasyonunun doğum ağırlığı ve doğum haftalarının daha düşük olmasından dolayı daha fazla zon 1 hastalık geliştirdiği tespit edilmiştir (28). Gelişmiş ülkelerde ROP'a bağlı körlük genellikle doğum ağırlığı 1000 gramın altındaki en küçük ve immatür bebeklerde gözlenmektedir. Bu ülkelerde ROP'a bağlı körlük prevalansı düşük doğum ağırlıklı, düşük gestasyonel yaştaki bebekler de sağ kalımın arttığı gözlenmesine rağmen değişmemektedir. Bu durum yenidoğan bakımında giderek artan oranlarda karmaşık teknolojilerin kullanımıyla daha net açıklanmaktadır. İmmatür bebeklerin sağ kalımlarının artması ile birlikte hastalık profilinde değişim oluşmaktadır. Agresif arka segment retinopatisi (APROP) olarak da isimlendirilen, arka kutup (zon 1) yerleşimli ROP bu çocuklarda daha sık görülmektedir. Çok geniş avasküler retina sahalarıyla karakterize APROP hastalarında lazer tedavisi yüksek komplikasyon ve belirgin düşük başarı oranları nedeniyle şu an için yerini intravitreal anti-VEGF tedavisine bırakmış durumda olduğu bilinen bir gerçektir (29).

Bazı yeni çalışmalarda CRYO-ROP ve ETROP çalışmalarına göre daha düşük oranlarda ROP sıklığı olduğunu bildirilirken, yapılan bir diğer çalışmada ise daha yüksek sıklıkta ROP geliştiğini göstermektedir (27-30).ROP'nin yaygınlığı ve şiddeti ROP tanımlarının Uluslararası Sınıflandırmasında geleneksel olarak lokallik bakımından (bölgeler; I ila III), şiddet (aşamalar; 1 ila 5), kapsam (1 ile 12 saatleri arası) ve vasküler dilatasyon ve tortuosite (artı hastalık) açısından tanımlanır (ROP 1984 Sınıflandırması Komitesi) (31).

Çalışmalardaki düşük sıklık değerleri çalışmaya alınan yenidoğan sayısının yetersiz veya az olmasına bağlı düşünülürken, sıklığındaki artış günümüz yenidoğan yöntemlerindeki ilerlemelere bağlı olarak ileri derecede immatür yenidoğanların sağ kalım oranlarının artması ile olabileceği vurgusunun üzerinde durmuşlardır (32).

2.3. Risk Faktörleri

Prematüre retinopatisinin gelişiminde birçok etiyolojik faktör düşünülmüşse olsa da en iyi bilinen risk faktörleri DA (doğum ağırlığı) ve GY (gestasyonel yaş)'nın düşük olmasıdır. Özellikle 1000 gramın altında ve 28 haftadan erken doğan bebeklerde retinopati sıklığının belirgin olarak arttığı bilinen bir gerçektir (33,34) (Tablo 2.3) (35).

Tablo 2.3.ROP gelişiminde başlıca risk faktörleri

Gebelik yaşı ve doğum ağırlığının düşük olması
Oksijen tedavisinin süresi ve konsantrasyonu
Hemodinamik anlamlı kardiyorespiratuvar problemler
Hiperoksi/hipoksi, hiperkapni/hipokapni
Asfiksi, hipotermi, metabolik asidoz
Bir haftadan uzun süren mekanik ventilatör tedavisi
Bronkopulmoner displazi
Sepsis/menenjit, sistemik mantar enfeksiyonları
İntrakraniyal kanama
Kan transfüzyon sayısı, kan değişimi
Hiperglisemi/insülin kullanımı
Prematüre anemisinin tedavisi için erken eritropoetin kullanımı
Çoğul gebelik

2.3.1. Gebelik Yaşı ve Düşük Doğum Ağırlığı

Prematüre retinopatisi gelişmesinde rolü en iyi bilinen risk faktörleri düşük doğum ağırlığı ve düşük doğum haftasıdır. Günümüzde prematüre retinopatisi çok düşük gebelik haftalarında (24-27 hafta) ve düşük doğum ağırlığı (<1000 gr) olan yenidoğanlarda belirgin olarak daha sık ve daha şiddetli biçimde görüldüğü bilinmektedir (36).

2.3.2. Oksijen Tedavisi ve Süresi:

Oksijen uygulanma süresi, tekrarlayan oksijen değişimleri ve oksijen konsantrasyonunun, gestasyonel yaş ve doğum ağırlığından bağımsız bir şekilde prematüre retinopati gelişiminde etkin bir faktör olduğu görülmektedir (37). Doğumla birlikte monitörize edilmeye başlama, hiperoksiden ve tekrarlayan hipoksi-hiperoksi dönemlerinden önemli derecede uzak durma, verilen oksijen düzeyinin ölçülmesi ve

kısıtlanması, prematüre retinopati gelişimi ve sıklığını azaltılmak için önemli koruyucu faktörler arasında görülmektedir (38).

2.3.3.Hipokarbi-Hiperkarbi:

Prematüre retinopatisi gelişiminde hipokarbi veya hiperkarbinin rolü ile ilgili çelişkili sonuçlar ortaya atılmıştır. Hiperkarbinin vasodilatasyon ve dokulara oksijen taşınımında artmaya yol açması beklenirken hiperkapni şiddetli ROP riskinin artmasına neden olduğu görülmektedir (39,40), Başka bir çalışmada ise böyle bir duruma sebep olacak ilişkiye saptanmamıştır (41).

2.3.4. Genetik Faktörler:

ROP gelişiminin genetik kontrolüne yönelik ilgi gittikçe artmaktadır (42,43). Prematüre retinopatisinde %70 oranında genetik yatkınlık olduğu düşünülmektedir (44). Her ne kadar ROP'un farklı etnik gruplardaki etkileri çok ilgi çekmemiş olsa da, Vietnam (45) ve Hindistan kaynaklı bazı çalışmalarda daha matür prematüre bebeklerde daha yüksek sıklık ve şiddette ROP vakaları bildirilmiştir; bu durum muhtemelen yenidoğan yoğun bakım üniteleri ve uzmanların standart bakım koşullarına sahip olmamalarından kaynaklanıyor olabilir. Norrie hastalığı ve ailevi eksüdatif vitreoretinopati genlerindeki mutasyonlar gibi diğer bazı genetik faktörler de şiddetli ROP ile ilişkili olabilir (46). PR beyaz ırkta ve erkek bebeklerde kız bebeklere göre daha yüksektir (47). Günümüzde PR patogenezinde, genetik polimorfizm konusunda en sık olarak incelenen gen VEGF'dir (48).

2.3.5. Diğer Risk Faktörleri:

Kan değişimi ve transfüzyonu sırasında kullanılan kanların erişkin tipi hemoglobin içermesi nedeniyle dokulara daha yüksek oranda oksijen gittiği için böyle bir durum retina damarlarında hasar verici etki yaparak PR gelişimini tetiklemektedir (49).

Prematüre retinopatisinin patogenezinde antioksidan moleküllerin yer aldığı için antioksidan vitaminler olan A ve E vitaminlerinin PR'yi azaltabileceği düşünülmüştür. Farklı dozlarda E vitamini tedavileri denenmiş ve önemli derecede PR gelişimini düşürdüğü görülmüştür (50).

Rekombinant EPO tedavisi PR için bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bronkopulmoner displazi gelişen bebeklerde daha ileri evre PR geliştiği saptanmıştır (51).

2.4. Patofizyolojisi

2.4.1. Embriogenez

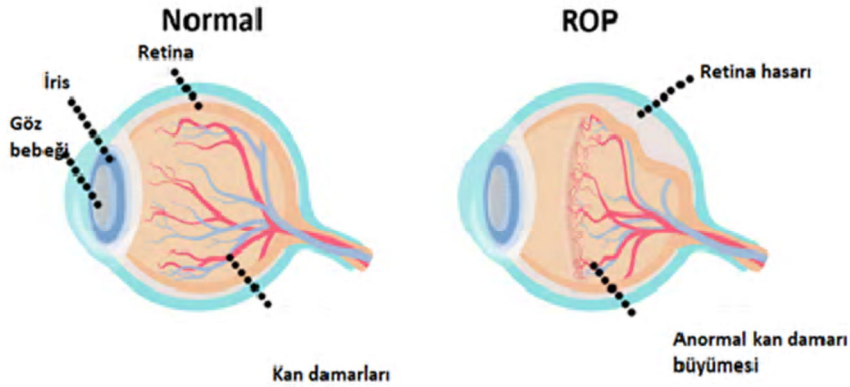
Göz, gelişimin 3. haftasında prozensefalonun dışa çıkıntı yapması ile optik vezikül halinde ortaya çıkmaktadır. Fetal gelişimin 4. ayı ve 18. Embriyonik retina oluşumu gözlenene kadar avaskülerdir. Bu dönem süresince gelişimini gösteren lens ve ön segmenti hyaloid arter vasıtasıyla besinini alabilmektedir. Başlangıçta hiçbir yan dal vermeyen hyaloid arter ve bu sebeple gelişen retina koroid damarlarından difüzyonla beslenmesini gerçekleştirir. Koroidin gelişimi ise gestasyonun üçüncü ayında tamamlanmasını bitirir (52).

2.4.2. Normal Retina Damar Gelişimi

Bebeklerde normal retinal vaskülarizasyon 14 haftalık gebelikte başlar (53) ve gestasyonun 16. haftasında mezenkim dokusundan oluşumunu sürdürür. Kan damarı öncüsü optik diskten nazal ora serrataya 8. ayda, temporal ora serrataya doğumdan kısa süre sonra ulaşır (54,55,56). Gebeliğin ilk haftaları retinanın metabolik ihtiyaçları, koroidden difüzyon yolu ile sağlanır. Altıncı gebelik haftasında vitreus kavitesi içinde beliren hyaloid arter, lensin ve ön segmentin beslenmesinden sorumlu arterdir. On altıncı haftadan itibaren hyaloid arterin adventisiasından köken alan mezenşimal iğsi hücreler, kistoid boşluklardan retina periferine doğru ilerleyiş göstermektedir. Işınsal tarzda göç eden bu hücreler, ora serrataya uzanan bir örtü oluşumu meydana getirdiği gözlenmektedir. İğsi hücreler, nöroglial hücreler olarak bilinir ve retinanın damarsal yapısının gelişimine kadar geçen bu süreçte retinanın enerji ihtiyacını karşılama görevini üstlenmektedir. Primitif endotel hücreleri ise iğ hücrelerinin arkasında bulunan hücreler artçıl hücreler olup zamanla lümen kazanarak damarları oluşturduğu gözlenir (57-58). İnsan retinal vaskülatürün oluşumu sırasında, farklı hücre tipleri karmaşık yollarla etkileşir, bu da dokunun metabolik ihtiyaçlarına iyi uyan bir vasküler ağacın oluşumu ile sonuçlanır. İnsanlarda retinal vaskülaritesi gelişim süreci, invazyondan önce gelir. Kan damarları tarafından kaplanmadan önce, bu astrositler hipoksiyi tecrübe

ederler ve vasküler cephe de endotelial hücrelerin göçünü, farklılaşmasını ve proliferasyonunu stimüle eden VEGF üretirler (59-60).

En çok kabul gören hipoteze göre hastalık 2 faz içerisinde gelişmektedir. Birinci fazda doğum sonrası verilen ilave oksijen ve ekstrauterin hayatın yüksek oksijen konsantrasyonu normal damar gelişimini durdurmakta, vazo-obliterasyona ve vasküler endotelial growth faktör (VEGF) ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır. Bebeğin büyümesiyle birlikte artan retinal metabolik ihtiyaca karşılık verilememesi avasküler, iskemik retina sahalarında VEGF ekspresyonunu artırmakta, göz içerisinde neovaskülarizasyona neden olmaktadır. Klasik ROP lezyonları olan neovasküler damarlar, tedavi edilmediği takdirde traksiyonel retina dekolmanı ve körlük meydana getirmektedir (61). İkinci fazda ise hipoksinin uyardığı retinal neovaskülarizasyon fazıdır (58-62) ve avasküler retinaların yüksek metabolik talepleri ile kombine edildiğinde damar kaybının neden olduğu nispeten hipoksik ortam, anormal neovaskülarizasyona neden olan çeşitli anjiyogenik faktörlerin düzenlenmesine yol açar. Çoğu bebekte yeni damarlar herhangi bir önceki bir hastalığın veya yaralanma sonucu oluşan bir durum olmaksızın gerilemiştir. Bununla birlikte, bazı bebeklerde neovaskülarizasyon kontrol edilmez ve retinal skar, skarlaşma ve nihayetinde kırılmaya neden olur (Şekil 2.4.2) (63). Bu evre diğer proliferatif retinopatilere benzemektedir. İskemik hale gelen avasküler retinada VEGF üretimi indüklenir (58,62,64). Eğer avasküler retina alanı küçükse, fizyolojik VEGF seviyeleri üretilir ve normal retina damar gelişimi gözlenir. Eğer avasküler retina alan genişse ve yüksek miktarda VEGF üretiliyorsa, vasküler ve avasküler retina sınırında, henüz gelişimini tamamlamamış retina damarlarının arterio – venöz (AV) şantı oluşturması indüklenir (ROP evre 1 ve 2). Gerileme eğer VEGF, arterio – venöz şanttan avasküler retinaya normal vaskülarizasyonu uyarırsa gözlenir. Diğer tarafta çok geniş avasküler retina alanları VEGF miktarını artırarak durumu arterio – venöz şantı neovaskülarizasyona çevirmektedir (ROP evre 3). VEGF seviyesinin uzun süreler yüksek kalması vazodilatasyona ve arka kutup damarlarında kıvrım artışına sebep olabilir, iris damarlarında dilatasyona ve rubeozis iridise de sebep olabilmektedir (artı hastalık) (62).



Şekil 2.4.2. Göz anatomisinin ve prematüre retinopatinin şematik gösterimi. Soldaki göz retinayı ve kan damarlarını içeren normal yapıyı gösterir. Sağdaki göz, prematüre retinopatisini gösterir ve kan damarlarının anormal bir şekilde geliştiğinde nasıl görüldüğünü ve retinanın ayrıldığında nasıl görüldüğünü gösterir (2,65).

2.4.3. Patogenezde Etkili Temel Faktörler

2.4.3.1. VEGF Tarihçesi

Judah Folkman 1971 yılında anjiyogenezin inhibisyon ile bir kanser tedavi aracı olarak kullanılması fikrini ortaya atmış ve tümör anjiyogenez faktörlerini keşfetmeye yönelik çalışmalara öncülük etmiştir. VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde vasküler sızıntı başlattığı için vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir.

1983 yılında Senger ve Ferrera tarafından tümör hücrelerinin ve kapillerlerin proteinlere geçirgenliğini artıran bir protein olarak tanımlanmıştır (67,68). 1989'da ise bu aileden ilk özel anjiyogenik buyume faktörü ayrıştırıldı ve buna vaskülotropin veya VEGF adı verildi (69,70).

VEGF, 6. kromozomun kısa kolunda (6p 21,3) lokalize molekül ağırlığı 45 kDA olan bir sitokindir (50,51) Vegf geni protein yapısı İnsanlardaki VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yerleşmiştir. Kodlayıcı bölge ~14 kb'lik bir alan kaplamaktadır ve 8 exon'dan oluşmaktadır. Tek bir pre-mRNA'nın alternatif splicing'i (birleştirilmesi) çok sayıda farklı VEGF türünü oluşturur (71).

2.4.3.2.Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenez, endotelyal hücrelerin önceden var olan damar sisteminden filizlenmesiyle yeni kan damarlarının oluşumudur (72). Vaskülojenez (anjiyoplast kaynaklı kan damarlarının oluşumu) esas olarak embriyonik gelişim sırasında ortaya çıkarken, anjiyogenez yetişkin yaşamı boyunca gerçekleşir (73,74). Pro-anjiyogenik endojen moleküller arasında, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), kan damarı oluşumunun başlıca düzenleyicisidir (75). Başlangıçta VEGF, kan damarlarının geçirgenliğini artırma yeteneğinden dolayı vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak adlandırıldı (76-77). VPF'nin endotelyal hücreler üzerindeki ek etkilerinin ve müteakip klonlamanın sonraki gözlemlerini takiben VPF, VEGF olarak yeniden adlandırıldı (78).

2.4.3.3. VEGF Familyası ve Reseptörleri

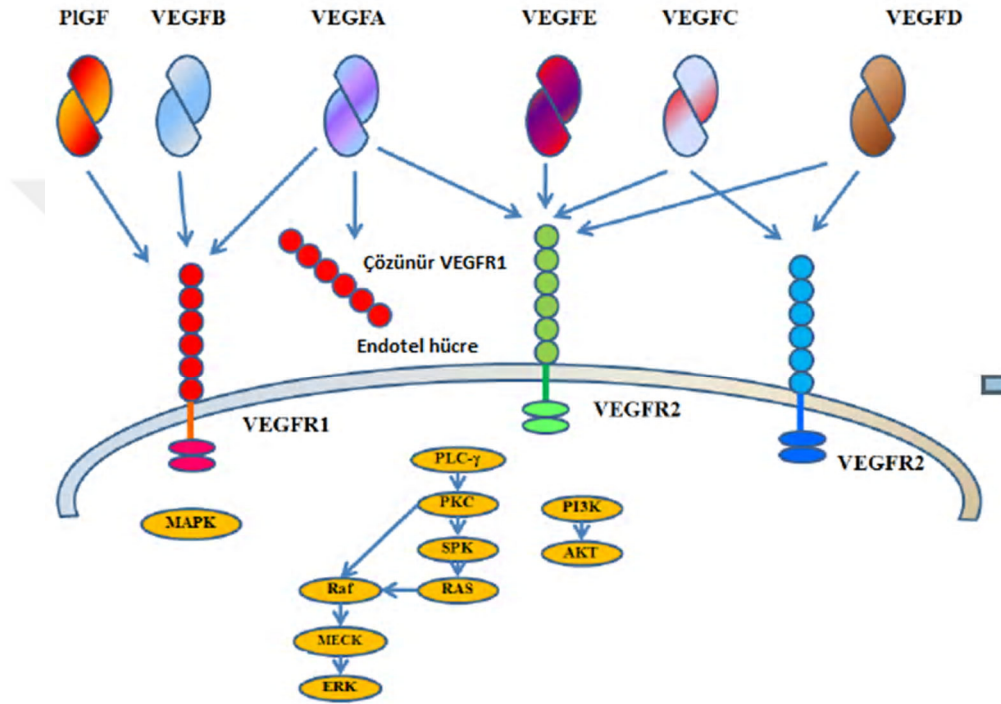
VEGF protein ailesi, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plasental Büyüme Faktörü (PlGF), virüs kodlu VEGF-E ve yılan zehiri türevi VEGF-F içerir. (79,80). VEGF-A, anjiyojenik süreçlerin en güçlü uyarıcısı olan en önemli aile üyesidir (81). VEGF-A, katlanmış bir yapıya monte edildiğinde intramoleküler disülfür bağları oluşturan sistein kalıntılarının bir merkezi düğüm motifi temelinde, proteinlerin "Cys-loop" süper familyasına ait büyük bir anti-paralel homodimerik peptittir (82,83). VEGF-A, endotelyal hücreler (84) fibroblastlar olmak üzere birçok hücre tipi tarafından (85), VEGF-A sekresyonu da iskemi ve inflamatuvar uyaranlarla tetiklenir (86).

VEGF-A'ya verilen hücresel yanıtlar, esas olarak, bunların kognat reseptörlerine vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörlerine (VEGFR'ler) bağlanmalarıyla sürülür. VEGFR'ler, sınıf IV reseptör tirozin kinaz (RTK) familyasına aittir (87) ve tip III RTK'lar trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptörü (M-CSFR), c-KIT ve fms-benzeri ile benzerlikler gösterirler. tirozin kinaz 3 (FLT3) (88). Ayrı genler tarafından kodlanan üç VEGFR alt tipi vardır: VEGFR1 (farelerde Flt-1) ve VEGFR2 (Flk-1; KDR) yapısal olarak benzerdir, oysa VEGFR3 (Flt-4) proteolitik olarak işlenmiş hücre dışı bir alana sahiptir (89).

VEGF-A izoformlarının VEGFR1 ve VEGFR2 ile sinyalizasyonu fizyolojik ve patofizyolojik anjiyogenez yönlendirirken, lenfanjiyogenez VEGFR3 ile VEGF-C / D izoformları aracılığı ile gerçekleşir (90). VEGFR1'in VEGF-A için VEGFR2'ye göre daha yüksek bir afinitesi olmasına rağmen, tirozin kinaz aktivitesinin azaldığını gösterir

ve bu nedenle büyük ölçüde VEGFR2 aktivitesini negatif bir şekilde modüle edebilen bir bozucu reseptör olarak kabul edilir (Şekil 2.4.3.3) (91,92).

Büyüme faktörleri arasında üzerinde en çok çalışılan faktör VEGFR'dir. Vasküler permeabilite faktörü veya vaskulotropin olarak da bilinmektedir.



Şekil 2.4.3.3. VEGF ailesi ve reseptörleri. VEGFA, hem VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanır. PlGF ve VEGFB sadece VEGFR-1'i bağlar. VEGFC ve VEGFD VEGFR-2 ve VEGFR-3'e bağlanır. VEGFR-2, EC mitogenezinin ve sağkalımının ana aracıdır. VEGFR-1, EC'de etkili bir mitojenik sinyal aracılığı etmez ve VEGFA'yı tecrit ederek VEGFR-2 ile etkileşimini önleyerek bir inhibitör rol oynayabilir (93).

2.4.3.4. VEGF-A İzoformlarının Üretimi

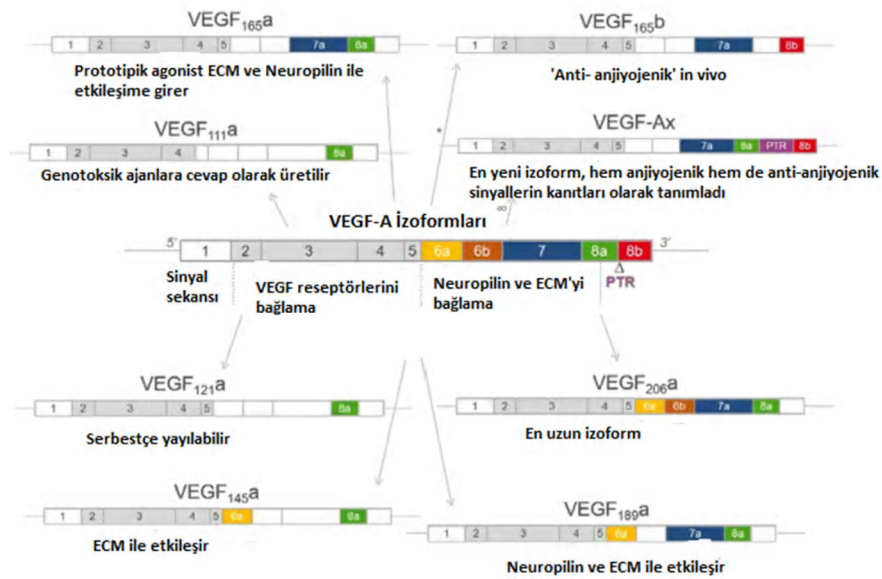
Vasküler beslenmenin düzenlenmesi, oksijen ve besin düzeylerindeki değişikliklere karşı reaktif olan bir mekanizma yoluyla (pro-anjiyojenik) veya inhibe (anti-anjiyojenik) damar gelişimini destekleyen faktörler arasındaki sıkı düzenlemeye dayanır. VEGF-A transkripsiyonu, hipoksi sırasında (94-95), büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar, yoksunluk stresi, genotoksik ajanlar (96) ve hem onkojenlerin hem de tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini takiben yerel hücre ortamından etkilenir

(97-98). VEGF-A izoformları uzunluklarına göre farklılık gösterir ve VEGFxxx olarak adlandırılır, burada xxx son protein dizisinde bulunan amino asitlerin sayısını temsil eder. Günümüze kadar 16 farklı VEGFA izoformu en yaygın olarak VEGF111, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 olmak üzere altı transkript olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 2014 yılında programlanmış translasyonel okumadan (PTR) kaynaklanan ek bir izoform VEGF-Axe tanımlanmıştır (99). VEGF165a, fonksiyon, sinyal verme, ekspresyon ve patolojik rolleri açısından karakterize edilen ve en kapsamlı olarak araştırılan ilk izoform olmuştur (75). Güçlü bir anjiyogenez uyarıcısı olarak VEGF165a prototipik pro-anjiyojenik VEGF-A izoformu olarak kabul edilir. Değiştirilmiş VEGF-A izoform ekspresyonu, fizyolojik ve / veya patolojik koşullar altında dokularda iyi belgelenmiştir (100-101). Eksonlar arasındaki sınırlar, çekirdek olarak adlandırılan çekirdekte dinamik bir protein kompleksi tarafından tanınan, küçük küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) -U1, U2, U4, U5 ve U6 artı ilgili aksesuar proteinleri içeren yerleştirme bölgeleri ile tanımlanır (102). U2AF ve SF1. VEGF-A birleşmesi, bir dizi RNA-bağlayıcı proteinler, en yaygın olarak serin / arginin (SR) proteinleri, özellikle SRSF1, SRSF2, SRSF5 ve SRSF6 tarafından düzenlenir (99). SR proteinleri, sitoplazmada çoklu serin / arjinin ve prolin / serin tekrarlarında fosforillenir, daha sonra çekirdeğe translokasyona izin verir ve bağlantının mekansal olarak düzenlenmesine izin verir. Çekirdeğe girdikten sonra, SR proteinleri tipik olarak VEGF-A pre-mRNA-eksonik sekanslerdeki (102-103) düzenleyici bölgelere bağlanırlar- bu da ekzonun çıkarılmasını tetikler. SR proteinlerinin fosforile edilmesinden sorumlu böyle bir kinaz, yapısal olarak aktif kinaz SRPK1'dir (102).

Her izoformda yer alan farklı eksonlar farklı özellikler verir. Eksonlar 1-5, temel eksonlardır ve bu nedenle tüm VEGF-A izoformlarında mevcuttur. Bunlar, VEGF'nin işlenmiş formunda bağlanan bir sinyal dizisini (eksonlar 1/2), bir glikosilasyon mevkisini (Asp74), bir potansiyel plazmin yarıлма bölgesini (Arg110 ve Ala111) ve VEGFR1 ve VEGFR2 bağlayıcısından sorumlu tortuları kodlarlar (104). VEGF111 ve VEGF121'in daha kısa izoformları, 6 ve 7 nolu eksondan yoksundur ve bunun bir sonucu olarak hücre dışı matrise (ECM) bağlı değildir ve serbestçe yayılabilirler (105-106). Bunun aksine, her iki eksonu (6a ve 7) içeren VEGF145, VEGF189 ve VEGF206 izoformları, heparin sülfat glikoproteinlerine yüksek afinite ile bağlanabilir (107). Alternatif bir ekleme yapmanın ikinci bir ana alanı, ekson 8 içerisindeki diferansiyel 30

ek yeri alıcı sitelerinin seçimi ile gerçekleştirilir. 2002'de Bates ve ark. VEGF_{xxx}b izoformları ailesini tanımlamıştır (Şekil 2.4.3.4) (108). Bu izoformlar, proksimal ekleme yerinin aşağı akış yönünde 66 baz çifti bulunan bir bölgede distal yapıdırma nedeniyle ortaya çıkar ve ekson 8b'yi içeren izoformlarla sonuçlanır (100). Dizileri bakımından VEGF_{xxxxa} ve VEGF_{xxx}b izoformları sadece C terminallerinde bulunan altı amino asitte farklılık gösterir; VEGF_{xxxxa} izoformları CDKPRR sekansında sonlanırken VEGF_{xxx}b izoformları SLTRKD'de sonlanır (108). Hem in vitro hem in vivo ve deneysel merkezli kanıtlar, VEGF_{xxxxa} izoformları vasküler geçirgenlik, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve yer değiştirme ve anjiyojeniz (109) gibi önemli araçları olarak “pro-anjiyojenik” olduğu kabul edilirken, aksine, VEGF_{xxx}b izoformlarının “anti-anjiyojenik” olduğu bildirilmiştir.

Son zamanlarda Eswarappa ve ark. Tarafından tanımlanan VEGF-Axe. (110), 30 transle olmayan bölgedeki alternatif bir durdurma kodonunun varlığına bağlı olarak VEGF-A mRNA'nın kanonik durdurma kodonunun ötesinde uzatılmış bir translasyon sonucudur. PTR, trans düzenleyici bir faktör olarak görev yapan A2 / B1 ribonükleoprotein tarafından en azından kısmen düzenlenir. Elde edilen VEGF-Axe, ekson 8a-kodlu CDKPRR ve ekson 8b-kodlanmış SLTRKD dizileri de dahil olmak üzere 22 amino asit uzantısı içerir (51).



Şekil 2.4.3.4. Vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGF-A) izoformlarının yapısını şematik gösterimi (111).

2.4.3.5. VEGF-A Ligand / Reseptör Bağlama

VEGFR-2, 7 hücre dışı immünoglobulin (Ig) benzeri alan, tek bir transmembran sarmal ve bölünmüş hücre içi kinaz alanından oluşan büyük bir 151 kDa membran proteindir (112). VEGF-A, VEGFR2 için, bir VEGFR dimeri boyunca bir VEGF-A dimerinin bir stokiyometrisi ile Ig-benzeri bölgeler 2 (D2) ve D3 boyunca ortosterik ligand bağlanma bölgesini bağlayan bir endojen agonisttir (113,114) Her bir VEGF-A izoformu, ekson 2-5 tarafından kodlanan tortuları içerdiğinden, VEGFR1 ve VEGFR2 ile etkileşime giren tortular, alternatif ekleme ile çıkarılmaz. Her izoform aynı zamanda moleküller arası disülfür bağları oluşturan sistein kalıntıları içerir, öyle ki tüm izoformlar dimeriktir ve ayrıca Cys-loop katlanmış yapıyı birleştiren moleküller arası disülfür bağları oluşturur.

VEGF-A ve VEGF-B hem yapısal hem de işlevsel olarak birbirlerine daha çok benzemektedirler. VEGF-C dördüncü kromozom üzerinde yerleşmiştir. VEGF-D, C-terminal bölgesinin sistein alanlarında yerleşmiştir. X kromozomu üzerinde bulunur. VEGF-E'nin etkisini KDR' ye bağlandığında ortaya çıkar. Endotel hücrelerin çoğalmasını ve kan damarlarının permabilitesini artırır. VEGF-F, C-terminal bölgesinin heparin bağlanma alanında yer alır. PlGF, VEGF ailesinde tanımlanan ilk plasenta büyüme faktörüdür. Ondördüncü kromozom üzerinde yer alır. Proteinlerin parçalandığı süreçte VEGFC ve VEGF-D' nin KDR' ye de bağlanmasını da kolaylaştırır (115).

2.4.3.6. VEGFR-2 Sinyali

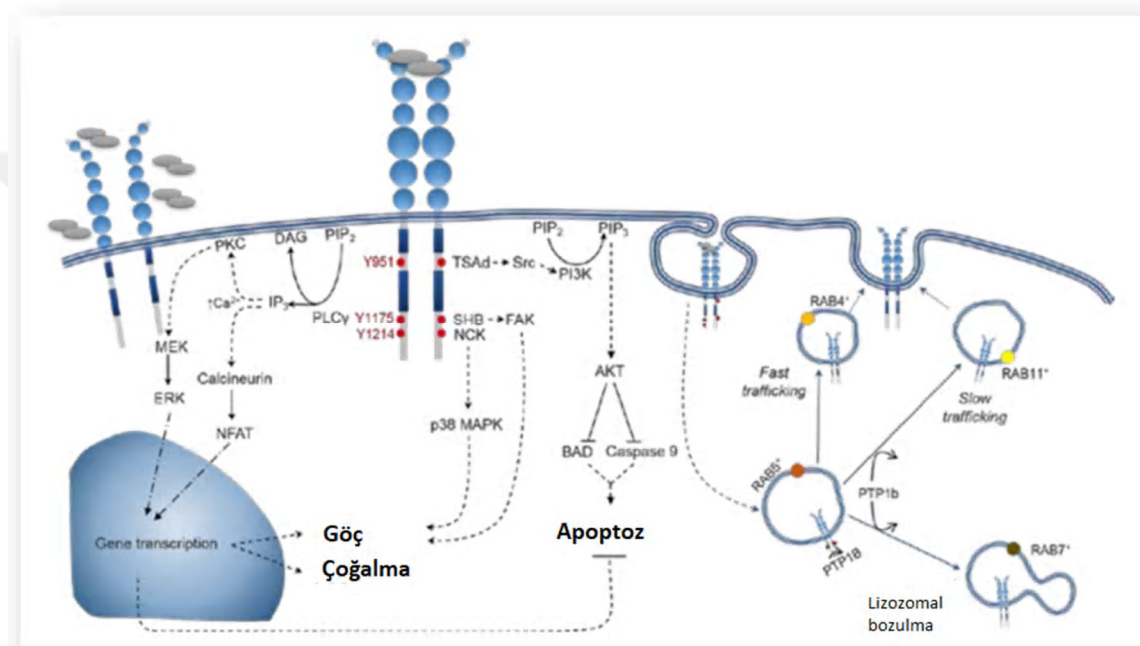
VEGFR-2 Aktivasyonu

VEGF-A izoformları, VEGFR2 aktivasyonunun aşağı akışında farklı sinyal sonuçlarına sahiptir. VEGFR2 aktivasyonu için gerekli bir adım olan ligand bağlanması, VEGFR2'nin hücre dışı bölgesi boyunca, elektron mikroskobu, küçük açılı X-ışını saçılımı ve yapısal olarak ilişkili VEGFR1'in tam uzunluktaki kristal yapısı ile gösterilen farklı Ig-benzeri bölgeleri yeniden yönlendiren konformasyonel bir büküme yol açar (115).

VEGFR2'nin hücre içi bölgesi daha sonra reseptöre olanak veren esnek N-lob yarığına ATP bağlanarak N- ve C-loblarından oluşan konformasyonel değişikliklere uğrar (116). C-lobundaki tirozin kalıntılarının intrinsik kinaz aktivitesi ve fosforilasyonu, aktivasyon döngüsünde Y1054 ve Y1059, kinaz insert alanında Y951 ve Y1175 ve Y1214 sırasıyla

Tirozin fosforilasyonu, sitoplazmik adaptör proteinlerinin alımı için bağlanma bölgeleri oluşturur ve sinyalleme yollarını başlatır (117).

VEGFR2 aktivasyonunun akış aşağısındaki sinyal yolları çok sayıda hücrel yollara yol açar. EGFR2 sinyallemesi ayrıca FAK alımına (117,118), p38 MAPK aracılı aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve eNOS aktivasyonuna ve vasküler geçirgenliğe yol açar. (Şekil 2.4.3.6) (119)



Şekil 2.4.3.6. VEGF-A'nın aracılık ettiği VEGFR-2 sinyal transdüksiyonu ve değişim yolları (114-119).

İncelenen seçici izoformlardan VEGF165a'nın, VEGFR2 (Y1175 artığı), AKT ve ERK'nin en yüksek fosforilasyon seviyelerini indüklediği gösterilmiştir (67). Ek olarak, VEGF165b, VEGF165a'ya göre azaltılmış etkililiğe sahip olsa da, VEGF165a'ya benzer bir potansiyelli tek başına VEGFR2 eksprese eden HEK293 hücrelerinde NFAT üretimini stimüle edebilir (120). Fenotipik olarak hem transendotelial elektrik direnci hem de floresan FITC'ye konjuge edilmiş makromoleküller ile ölçülen VEGF165a'ya kıyasla VEGF165b tedavisi ile azalmış vasküler geçirgenlik gözlenmiştir (121). VEGF165a ile karşılaştırıldığında, VEGF121a ayrıca daha az HUVEC motilitesine ve çoğalmasına neden olmuştur (122).

ECM-bağlı izoformları, VEGF145a ve VEGF189a, gözlemlenen sinyal yoluna bağlı olarak VEGFR2'de agonizm kapsamındaki değişimleri de gösterir. VEGF165a ile ilişkili olarak VEGF145a, VEGF121a veya VEGF165b stimülasyonu ile gözlemlenen büyük ölçüde de olsa, anjiyogenez in vivo olarak stimüle edebilmektedir (123).

2014 yılında tanımlanmasının ardından, yeni VEGF-Axe izoformu, VEGF165b ile fonksiyonel benzerlikleri nedeniyle “anti-anjiyojenik” olarak da tanımlanmıştır. VEGF-Axe, incelenen sinyal yoluna bağlı olarak hem tam hem de kısmi agonizm kanıtı göstermiştir. Bununla birlikte VEGF Axe'nin, HVVEC'lerin vasküler geçirgenliğini ve ex vivo migrasyonunu indüklediği ve ayrıca, BAE proliferasyonunu VEGF165a stimülasyonu ile karşılaştırılabilir bir ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (104).

Diğer RTK'ler ve G proteinine bağlı reseptörler için gösterildiği gibi (124), VEGFR2, hem plazma membranından hem de hücre içi bölümlerden sinyal verebildiğinden endozomal sinyalleme geçirir. ERK aktivasyonu VEGFR2 endositozu gerektirir (125) VEGFR-2, hem plazma membranında hem de yapısal VEGFR2 internalizasyonu ve geri dönüşümüne bağlı erken endozomlarda lokalize olur (126). VEGFR2, klatrine bağlı (127) ve bağımsız mekanizmalar (128) yoluyla içselleştirilebilir. VEGF-A stimülasyonunu takiben, ligand-reseptör kompleksleri 15-20 dakika içinde internalizasyona uğrarlar. Ligand stimülasyonu ayrıca kısa zincirli Rab4-pozitif endozomlar veya uzun döngü Rab11-pozitif endozomlar aracılığıyla VEGFR2'nin plazma membranına geri dönüşünü tetikler (126). Alternatif olarak, ubiquitinasyon, lizozomal parçalanma için VEGFR2'nin proteolizini ve değişimi başlatabilir (129), VEGFR2'nin hücre içi- geri dönüşüm veya bozunma- erken endozomlarda aktive VEGFR2'nin varlığı maksimal ERK1 / 2 ve AKT aktivasyonunu indüklerken, p38 MAPK sinyal transdüksiyonu bağımlı olduğunda, sinyalleme yanıtının süresini, genliğini ve özgüllüğünü düzenler (130).

VEGF-A izoformu biyoyararlanımı, ECM ile etkileşime girme yeteneklerinin farklı şekilde etkilenmesinden büyük ölçüde etkilenmektedir. ECM'ye bağlanma, hücrelerin yakınında lokalize VEGF-A konsantrasyonları oluşturur; bu, daha kısa ve daha diffüz izoformlar oluşturmak için proteolitik olarak serbest bırakılabilir veya bölünebilir ve anjiyojenik ihtiyaç zamanlarında VEGF-A sinyalleşmesini artırabilen VEGF-A gradyanları oluşturabilir (131). Ekson 6a tarafından kodlanan ve VEGF145, VEGF189

ve VEGF206'da ve ekson 7 kodlu kalıntılarda bulunan kalıntılar, mutajenezle etkileşime girebilir (131).

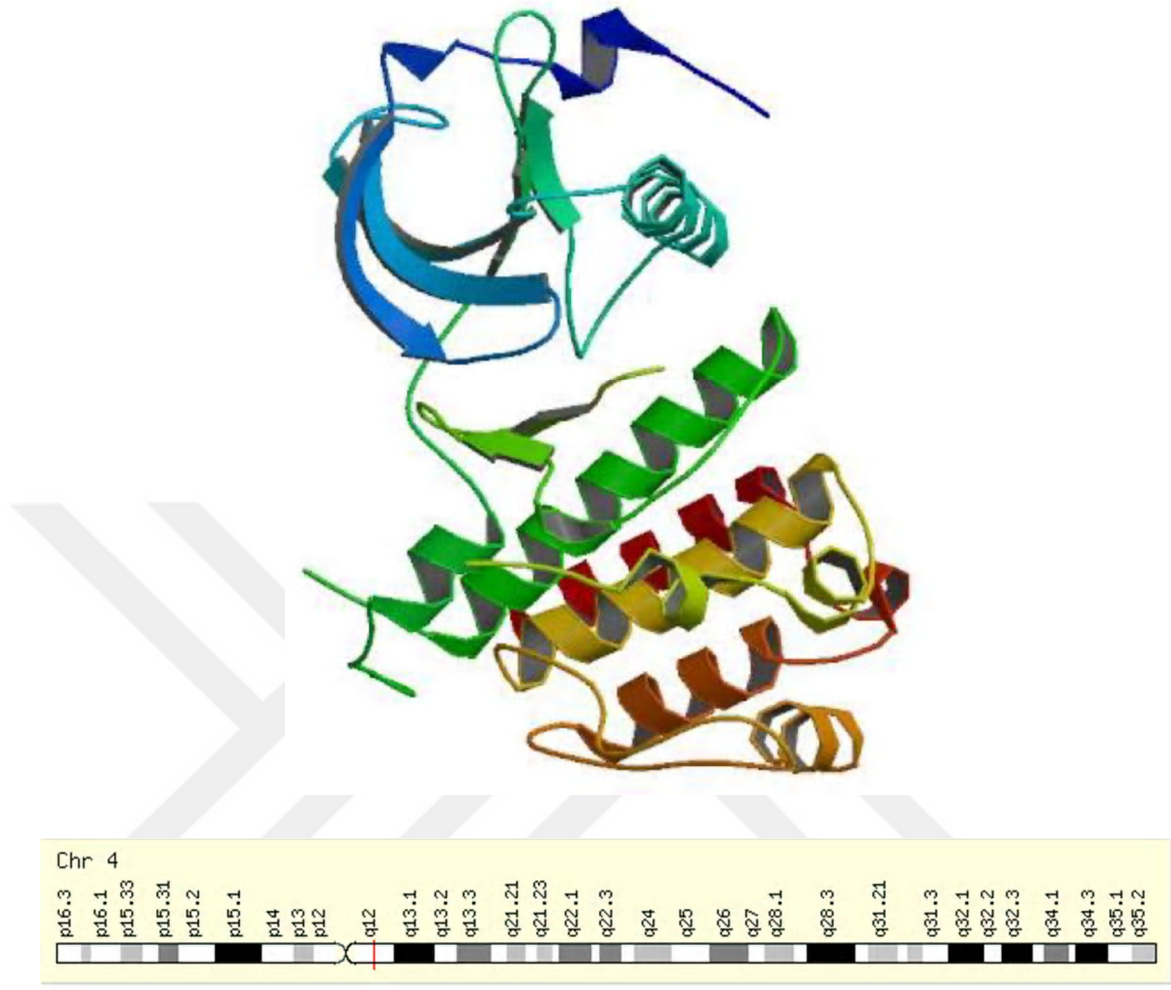
Son zamanlarda VEGF-A / VEGFR2 aracılı sinyalleme, bevacizumab kullanılarak dolaşımdaki VEGF-A'nın nötralize edilmesiyle hedeflenmektedir (132).

2.4.3.7. Vazküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptör -2 (VEGFR-2 'KDR')

VEGF ailesinden VEGF-A'nın izoformunun altıncı kromozomun kısa kolunun onikinci bantının üçüncü alt bantları arasındaki (4q11-12)'de yerleşim gösterdiği, Terman ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (133). Hücre yüzey reseptörleri VEGFR-1 ve KDR olmak üzere iki çeşittir. KDR, tip III tirozin kinaz reseptörüdür bu tirozin kinaz enzimleri protein fosforilasyonunda rol oynayan enzimler olarak bilinir. Tirozin kinazların önemli bir özelliği sinyal iletim mekanizmasında görevli olmalarıdır. Fetal Liver Kinase 1(Flk1) olan bir homoloğu da vardır (Şekil 2.4.3.7)' da KDR' nin üç boyutlu yapısı ve genomik lokasyonu verilmiştir. (Tablo 2.4.3.7)' de KDR geni için NCBI veri tabanında yer alan kimlik bilgileri verilmiştir.

Tablo 2.4.3.7. KDR geni kimlik bilgileri

Lokus	NG_012004, 54337 bç DNA çizgisel PRI
Tanım	Homo sapiens kinaz ekli alan reseptörü (tip III reseptör)
Erişim No	NG_012004, NM_002253
Organizma	Homo sapiens: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata;



Şekil 2.4.3.7. *KDR*(VEGFR-2) geni üç boyutlu yapısı ve genomik lokasyonu (135,138). *KDR* geni VEGF kaynaklı endotel hücre proliferasyonu fonksiyonunun temel aracıdır. Kinaz alanlarındaki tirozin rezidülerinin otofosforilasyonu ve endotel hücrelerindeki *KDR* aracılığıyla VEGF' in mitojenik ve kemotaksisitesini aktive ederek VEGF' in izoform-1 (VEGF165)' e bağlanmasıyla da hem hücre membran geçirgenliğini artırarak fosforilasyonu başlatır hem de mitojen aktivite protein kinaz (MAP kinaz), AKT, eNOS gibi sinyal yollarının aktivasyonu için kolaylık sağlar. Bu yollar endotel hücrelerin çoğalması ve göçü için gereklidir. VEGF-A, VEGF-C ya da VEGF-D' ye bağlanması da dimerizasyonuna ve tirozin rezidüleri yoluyla otofosforilasyona sebep olup *KDR* aktivitesi artmasını sağlamaktadır. Bu aktivasyon protein tirozin kinaz (PTK) inhibitörü olan SU5614 (((3Z)-5-Chloro-3-[(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene]-1,3-dihydro-2Hindol-2-one) ile inhibe edilir. Bu inhibasyon sonucu ile de embriyonik hematopoezde

temel görev alır. KDR proteini, sitoplazmik veziküllerde de görülür ve hücre membranı, sitoplazma, nükleus ve erken endozomlarda yerleşim göstermiştir. Bir hücre yüzey 14 belirteci olan KDR proteini sinyalizasyonu endotel prekürsör hücrelerin farklılaşmasına yol açar. Endotelyal progenitör hücreleri (EPH), endotelyal hücreler, ilkel ve olgun hematopoetik hücreler gibi çok çeşitli bölgelerde ifade olabildiği gözlenmiştir. VEGF, *KDR*' ye bağlandıktan sonra EPH' deki ve endotelyal hücrelerdeki birçok erken sinyal yolağının aktive olmasını sağlar (134).

Kinase insert domain-containing receptor (*KDR*) geninin bilinen 30 çeşit ekzonu vardır. 1356 aminoasitten oluşur ve 151.527 Dalton ağırlığındadır. İkinci ve üçüncü bölgesi VEGF-A' ya bağlanan hücre dışı alanı (I-VII) ve sistein rezidüleri arasında disülfid bağlarıyla stabilize edilir. 70 aminoasitlik iki çeşit kinaz-ekli hücre içi bölge alanı ile hücre dışı bölgeden ayrılmaktadır. Onaltıncı ekzonda 20 aminoasitlik helikal transmembran alanı bulunmaktadır. Onsekizinci ekzonda ise 9 aminoasitlik nükleotid bağlanma bölgesi yer alır. Aktif bölge olarak yer alan yirmikinci ekzonunun aspartik asit (D) kodlayan (GAC) bölgesi *KDR* geninin ATP bağlanma bölgesi asparajin (K) kodlayan (AAA) bölgesi olarak yerleşmiştir. On yedinci ve yirmialtıncı ekzonları arasında yer alan protein kinaz alanı ise onyedinci ve yirmialtıncı ekzonları arasında yerleşmiştir. Juxtamembranın 43 aminoasitlik alanında oluşan mutasyon ligandan bağımsız reseptör aktivasyonunun oluşmasını tetikler. Reseptör aktivitesinin düzenlendiği bu alan aynı zamanda tirozin kinaz alanlarının bağlanma bölgesi olarak işlev görür. *KDR* geninin intraselüler alandaki 5 tirozin rezidü ana fosforilasyon alanı olarak tanımlanan (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 ve Y1214) fosforilasyon alanlarında oluşan fosforilasyon, hemen yakınındaki aminoasit dizisi ile birlikte yapısında SH2 bölgesi barındıran sinyal iletim molekülleri için bağlanma bölgesi sağlar (135).

2.5. Rop Hastalarının Klinik Özellikleri

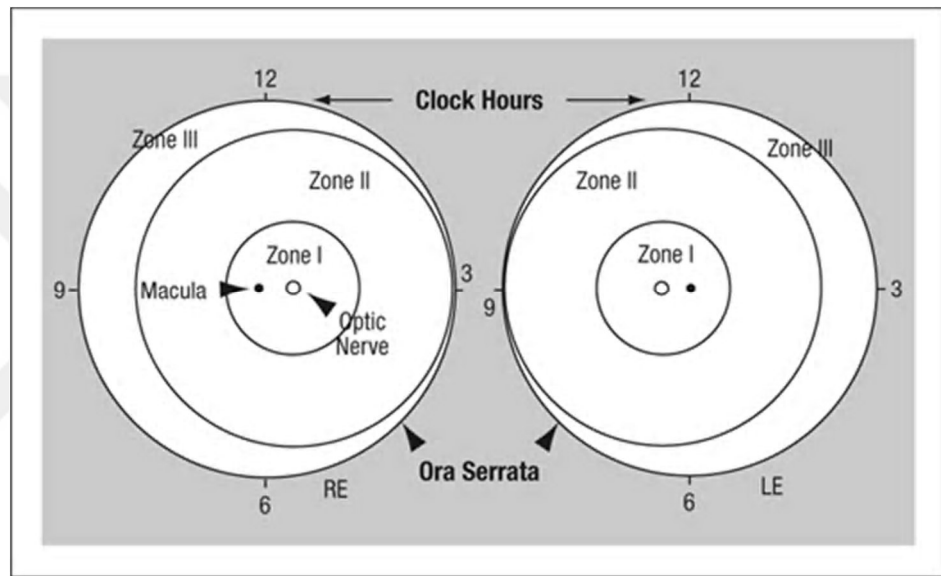
ROP ilk kez 1984 yılında uluslararası bir komite tarafından "The International Classification of Retinopathy of Prematurity -ICROP" adıyla sınıflandırılma yapılarak yayınlanmıştır. Bu sınıflandırmada; Yerleşim alanı, Tutulum miktarı, Vasküler proliferasyon evresi, Artı (plus) hastalık varlığı olmak üzere 4 parametre mevcuttur (136).

2.5.1.Yerleşim Alanı

Zon 1: Optik disk merkezli, yarı çapı optik disk merkezi ile maküla merkezi arasındaki mesafenin 2 katı olan dairesel alandır.

Zon 2: Zon 1'in periferik kenarı ile nazalde ora serrataya tanjansiyel olarak ulaşan disk merkezli daire arasında kalan alandır.

Zon 3: Temporal retinada zon 2'den arta kalan hilal şeklindeki anterior alandır (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5.1: ROP yerleşimini ve yaygınlığını göstermek için zon sınırlarının ve saat kadrantlarının kullanıldığı sağ göz (RE) ve sol göze (LE) ait şema (İCROP revisited jama ophthalmology 2005) (2005).

Hastalığın yayıldığı alan saat 1-12 arası saat kadrantı veya 30 derecelik meridyenler (saat kadrantı) olarak ifade edilir. Bu sınıflamada kolaylıkla saptanabilen dört tane anatomik odak noktası vardır; “optik sinir, maküla, nazal ora serrata ve temporal ora serrata”.

2.5.2. Hastalığın Vasküler Gelişim Evresi

Evre 1: Demarkasyon hattı: vasküler retina ile avasküler retina arasında ince beyaz bir hat bulunması ile karakterizedir.

Evre 2: Hacimli sırt (ridge): vasküler retina ile avasküler retina arasında yüksekliği ve genişliği bulunan hacimli sırt ile karakterizedir.

Evre 3: Neovaskülarizasyon: ekstraretinal fibrovasküler proliferasyonu mevcuttur.

Evre 4: Kısmi retina dekolmanı mevcuttur.

Evre 5: Total retina dekolmanı mevcuttur.



2.6. ROP Tedavi Uygulamaları

2.6.1. Anti- VEGF Tedavisi

ROP'un temel tedavi prensibi VEGF molekülünün baskılanmasıdır. Bu amaçla, VEGF üretimi avasküler retina sahalarının lazerle yakılmasıyla azaltılmakta ya da, mevcut VEGF göz içerisine enjekte edilen anti-VEGF ajanlarla bloke edilmektedir. Son yıllara kadar standart tedavi yöntemi olarak uygulanan lazer tedavisinin görme alanını kalıcı olarak daraltması, miyopi, anizometri, şaşılık gibi komplikasyonlara yol açması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacını tetiklemiştir. Lazer tedavisinin olumsuz yönlerini ortadan kaldırması ve yüksek tedavi başarı oranları nedeniyle anti-VEGF moleküllerin tercih edilme sıklığı her geçen gün artmaktadır (137).

Prematür yenidoğan kan beyin bariyeri term sağlıklı yenidoğanlara göre çok daha geçirgen olduğundan dolayı dolaşımdaki proteinler ve kimyasalların santral sinir sistemine ulaşmaları çok daha kolay gerçekleşmektedir. Anti-VEGF ajanların potansiyel zararlarının ortaya çıkarılması zaman alabilir. Bu ajanların belirlenebilmesi için yılların geçmesi, yenilikçi teknolojilerin ortaya çıkması gerekebilir. Yenidoğan için yaşamsal temeli olan VEGF molekülünün sistemik olarak baskılanmış olması gelişmekte olan bebek üzerindeki muhtemel etkilerinin saptanması gibi nedenlerle büyük önem taşımaktadır.

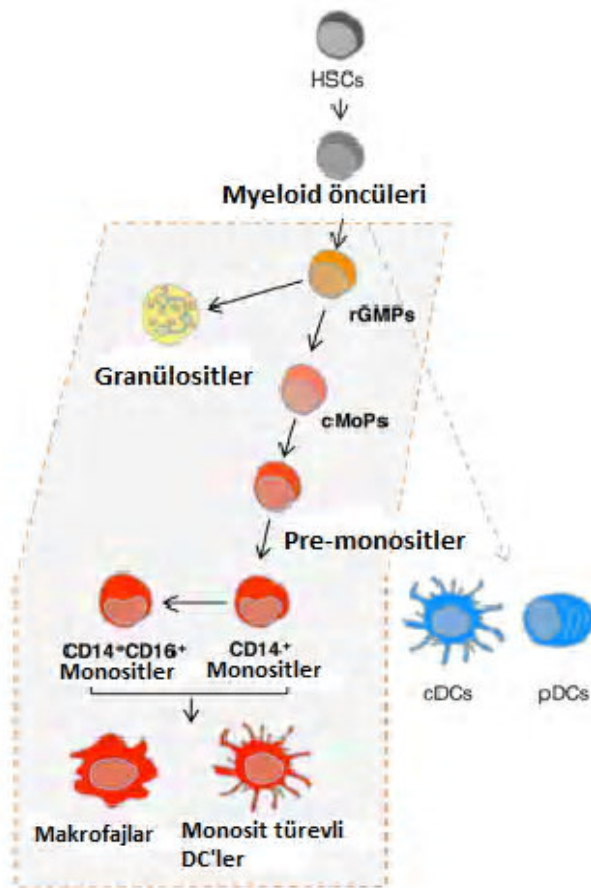
2.7. Monositer Progenitör Hücreler

DC'ler, monositler ve makrofajlar birbirleriyle yakından ilişkilidir ve uzun süredir tartışılmış olan ve sadece son zamanlarda farelerde geliştirilen hücre tipleridir. Farelerde, DC'ler ve monositler (MDP) ve ortak bir dendritik progenitör (CDP) hücreler son ifade olarak DC ile sınırlandırılmıştır (138-139). CDP, ön plazmasitoid DH'leri (pDC'ler) ve önceki DC'leri (cDC'ler) üretir, bunlardan ikisi BM'den ayrılır ve dokulara girmeden ve farklı DC'lerin alt sınıflarına girmeden önce üretilir (Şekil 2.7) (140).

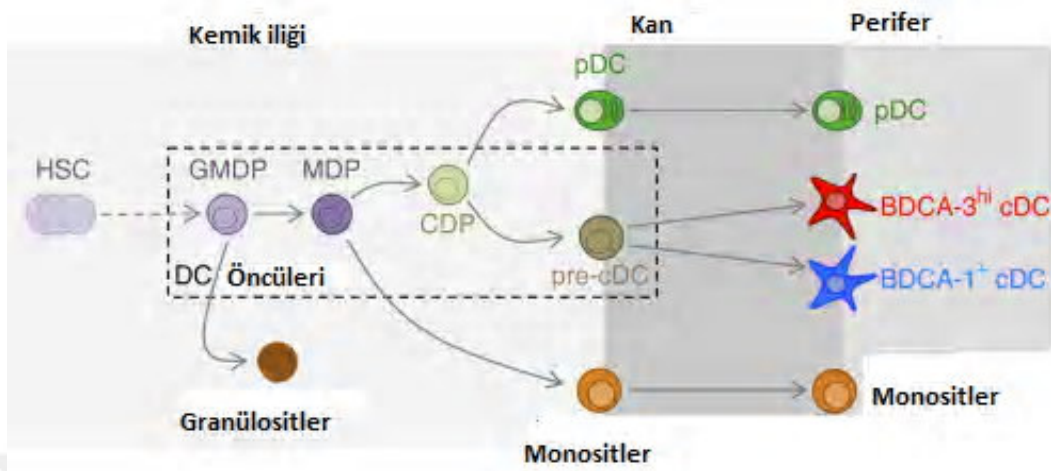
İnsan monositleri, in vitro kültürden sonra, sitokinlerin karışımı ile DC'lerin bazı fenotipik özellikleri ile güçlü antijen sunan hücrelere farklılaşmak için indüklenebilirler (141). Bununla birlikte, bu monosit türevli DC'ler, aktive edilmiş monositler ile cDC'lerden daha yakından ilişkilidir (142). Monositler, BM'de ortak monosit

progenitörlerinden (cMoP'ler) ortaya çıkar ve kanda bırakılmadan önce olgun Ly6Chi monositlerine dönüşürler. Diğer miyeloid hücreler ile karşılaştırıldığında, monositler BM boyunca aşırı kısa bir geçiş süresine sahiptir ve son bölümlerinden sonra hızla dolaşımında salınır. Sirkülasyona girdikten sonra Ly-6Chi monositleri, daha uzun ömürlü Ly6Clo monositlerine terminal farklılaşmasından (20 saatlik bir yarı ömre sahip olmaktan 20 saat önce bir yarı ömre sahiptir (Şekil 2.7.1) (143,144).

Dolaşımdaki monositler, tarihsel olarak doku makrofajlarını ve DC popülasyonlarını destekleyen öncü hücreler olarak görülmekle birlikte (145), Geleneksel GMP (Granulosit/monositProgenitör)'ler, dominant olarak granulosit monosit progenitörlerini içerir, fakat aynı zamanda T hücrelerine farklılaşabilen bazı hücreleri de içerir (115).



Şekil 2.7. İnsanlarda monosit gelişiminin şematize görünümü (146).



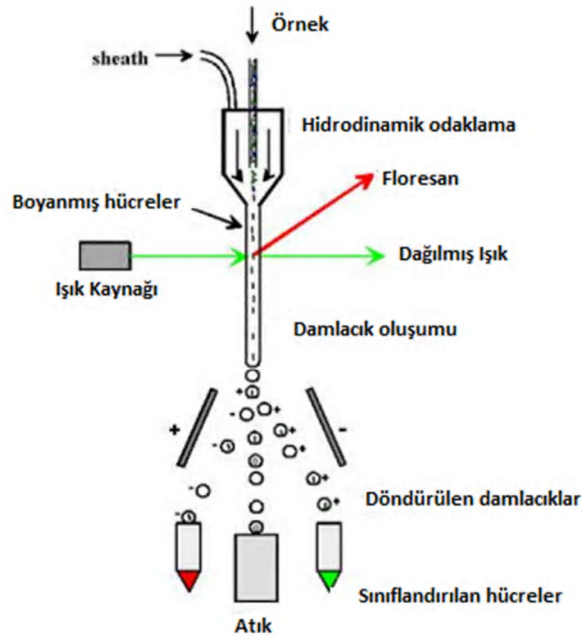
Şekil 2.7.1. İnsan dendritik hücre (DC) hematopoezisin şematik görünümü (147).

2.8. Yeni Doğan ve ROP Hastalarında Monositer Progenitör Hücreler

2.8.1. Monositer Progenitör Hücrelerin Akım Sitometri İle Tanımlanması

Akım sitometri, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akım sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir (148).

Akım sitometriler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevrimciler ve bilgisayarları içerir. Optik kısım lazer ışığı yayar ve ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklar (Şekil 2.8) (149).



Şekil 2.8. Akım sitometri genel çalışma prensibi. Örnek cihaza konur, boyalı hücreler borudan tek tek akarak lazer ışınından geçirilir ve hücreler ışık saçılımı ile floresan verir ve yüklerine göre ayrılırlar (150).

Akım sitometrede özgül antikorlarla saptanmak istediğimiz monositer progenitör hücre yüzeyi ve hücre içi antijenik yapıların varlığı ya da yokluğu saptayabilmek için uygulanan testtir. Kullanılan spesifik antikorlara göre istenilen hücre popülasyonunun belirlenmesi işlemi ile gerçekleştirilir.

2.8.1.Kullanılan Antikorlar ve Bağlandığı Bölgelerin Özellikleri:

Trombosit Endotel Hücre Adezyon Molekülü 1 (PECAM-1) (CD31): CD31 antijeni, immüoglobulin süper familyasına bağlı 130 kDa'lık bir transmembran glikoproteindir. Miyeloid soyun kök hücrelerinde, trombositlerde ve endotel hücre kavşaklarında ekspresyonu gösterilmiştir. CD31'in homofilik bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda heterofilik etkileşimlere aracılık eder, özellikle CD31, lökositlerin, endotelial hücre duvarı boyunca, alfa v beta 3 integrinine ve CD38'e yapışması yoluyla göçüne katılır. Ek olarak CD31, lökositlerde, intratostoplazmik tirozin kalıntıları 633 ve

686'nın fosforilasyonu ve SHP-1 ve SHP-2 ile tirozin fosfatazlarla sabodan birleşme yoluyla dışardan gelen sinyallemeye katılır. Çalışmalar, trombositlerin aktivasyonu ve agregasyonu için CD31 için benzer bir etki mekanizması olduğunu düşündürmektedir (151).

Kök Hücre Markırı (CD34): CD34 antijeni, iki farklı ekstrasellüser domen ile yaklaşık 110 kDa'lık bir monomerik transmembran fosfo glikoproteindir. Yaklaşık 110 amino asitlik zar proksimal alanı, muhtemelen bir küresel konformasyon benimsemektedir. Yaklaşık 104 amino asitten oluşan NH₂-terminal alanı, hem N-bağlı glikanlar hem de sialile O-bağlı karbonhidratlar ile ağır bir şekilde glikozile edilir ve muhtemelen müsin benzeri glikoproteinlerin tipik bir genişletilmiş çubuk benzeri yapısını sergiler. 34 antijeni, tüm soyların hematopoietik progenitör hücrelerinde, hem de en ilkel pluripotential kök hücrelerde eksprese edilir ve nesiller tarafından belirlenen progenitörler farklılaştıkça yavaş yavaş kaybolur. 34 antijeni, kılcal endotelial hücreler üzerinde ve kemik iliği stromal hücreleri üzerinde de bulunur. Normal hematopoez sırasında, soy bağıllığı ve hücrel olgunlaşma düzeyine bağılı olarak glikozilasyon varyasyonlarının oluştuğu düşünölmektedir (151).

Tip II İntegral Membran Glikoprotein (CD38): CD38 antijeni, sitoplazma içinde NH₂-terminali ile bir 45 kDa tek zincirli tip II integral membran glikoproteindir. CD38, NAD glikohidrolaz, ADP ribosilsiklaz ve siklik ADP riboz hidrolaz gibi çeşitli aktiviteleri olan bir enzimdir. CD38, aktive edilmiş T ve B lenfositleri, NK hücreleri, monositler, plazma hücreleri ve medüller timositler üzerinde eksprese edilir. CD38 ifadesi, hücrenin farklılaşması ve aktivasyonuna bağılı olarak görünmektedir. B hücre soyunda CD38, plazma hücrelerine terminal farklılaşması üzerine eksprese edilir. Benzer şekilde CD38, timositlerde ve aktive edilmiş T hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilir. Hem B hem de T soylarının en olgun lenfositleri 38 antijeni ifade etmez. CD38 yaygın T ve B lenfosit aktivasyonu incelemek için bir işaretçi olarak kullanılır (151).

GM-CSF Reseptör Alfa (CD116): Bir 75-85 kDa molekölü olan CD116 antijen, insan granölösit monosit koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) reseptör alfa zinciridir. 116 antijeni, lenfositler tarafından değil, öncüllerinin yanı sıra monositler ve granölösitler tarafından da ifade edilir. Ayrıca endotel hücreleri, fibroblastlar ve langerhans hücreleri üzerinde

bulunur. CD116, IL-3 ve IL-5 reseptörlerinin ortak beta zinciri (CDw131) ile GM-CSF için yüksek afiniteli bir reseptörden oluşur (151).

S-Endo (CD146): CD146 molekülü, immüoglobulin süper ailesine (IgS) ait, 118 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olan tek zincirli bir transmembran glikoproteindir. Hücre dışı yapı beş Ig benzeri alandan oluşur: iki V tipi ve üç C2 tipi Ig benzeri alan. 146 antijeni Igs ailesinin hücre adezyon molekülleri ile ilgilidir ve varlığı tek tabakalı bütünlük bölgelerinde yoğunlaşır. CD146, endotelde yapısal olarak eksprese edilir ve ayrıca düz kas hücreleri ve orta trofoblastlar gibi diğer hücre tiplerinde de gözlemlenir. Periferal tam kan lökositleri arasında CD146 ekspresyonu saptanmaz, aktive edilmiş T-lenfositlerin alt kümesinde beklenir (151).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptör 2 (CD309): KDR (kinaz insert alan reseptörü) veya flk-1 (fetal karaciğer kinaz 1) olarak da adlandırılan CD309 antijeni VEGF (vaskülerendotelyal büyüme faktörü) alıcı ailesine aittir. VEGFR-2 olarak bilinir ve VEGF ailesinin (VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (kdr / flk-1), VEGFR-3'ün (flt-4)) üç hücre sinaling tirozin-kinaz reseptörlerinden biridir ve vasküler gelişim ve vasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Bu reseptörler hücre dışı kısımlarında yedi immüoglobulin benzeri alan ve hücre içi kısımlarında iki tirozin kinaz alanı içeren transmembran proteinlerdir. KDR geni, 4q11-q12 kromozomunu eşler. CD309, VEGF için reseptördür, aynı zamanda VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'yi de bağlar. VEGF endotelyal hücrede eksprese edilen 309'a bağlanma yoluyla endotel hücre proliferasyonunu indükler ve hücre göçünü teşvik eder. CD309 embriyogenezin erken aşamalarında ifade edilir. VEGF'nin, kan damarlarının permeabilizasyonunun yanı sıra anjiyogenezin in vivo olarak indüklenebildiği ve vaskülojeniz regülasyonunda merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hem hematopoietik hücreler hem de hemoangioblast olarak adlandırılan endotelyal hücreler için bir CD34 +- CD309 + ortak prekürsörü tanımlayan CD34 pozitif hücrelerde ifade edilir (151).

2.9. Moleküler Analiz Yöntemleri

2.9.1. Real time PCR

Real-time PCR DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur (154). Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PCR yöntemi ve gen analizi

birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok isimlendirilme yapılan bu teknoloji yabancı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, “kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (152).

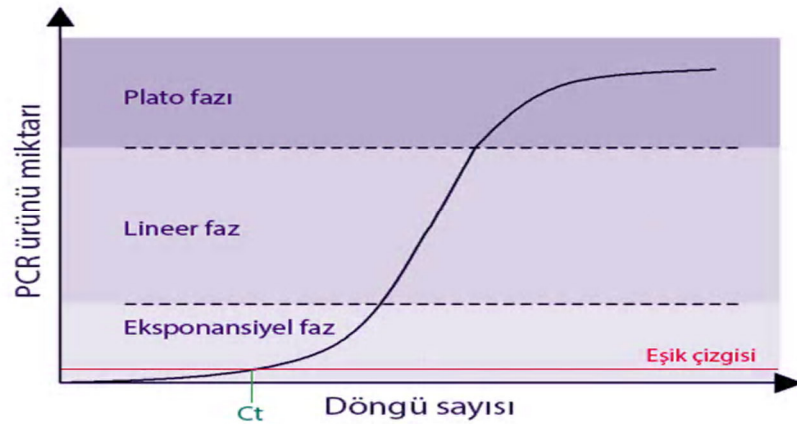
Biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen belirleme, DNA hasarı belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları mevcuttur (153).

Real-Time PCR'da iki farklı çalışma prensibi vardır. Bunlardan ilki diziyeye özgü olmayan belirleme yöntemidir. Bu yöntemde “SYBR Green I” gibi DNA'nın çift iplikli haline bağlanan floresan boyalar kullanılır. Diğer yöntemde ise diziyeye özgü problemler kullanılır. Bu problemler Real-Time PCR cihazları tarafından saptanabilecek florofor içerirler ve DNA'daki spesifik bölgesine bağlanırlar. Çok farklı şekillerde dizayn edilmiş problemler bulunmaktadır. Bunlar; hidroliz (TaqMan) problemleri, moleküler beacon, hibridizasyon problemleri, LightUp prob, scorpion prob ve single problemlerdir.

Çalışmamızda FAM ile etiketlenmiş, kilitli nükleik asit (LNA / locked nucleic acid) içeren hidroliz problemleri (Roche RealTime ready Catalog/Designer Assays) kullanılmıştır. Hidroliz problemlerinin 5' ucunda birraportör (R) florofor (ör. FAM), 3' ucunda ise floroforun yaydığı ışığı baskılayan (Quencer / Q) bir boya (ör. TAMRA) bulunur. Prob PCR'ın bağlanma aşamasında hedef dizisine bağlanır. Uzama aşamasında Taq DNA polimeraz proba ulaştığında 5' ekzonükleaz aktivitesi gösterir ve probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece baskılayıcı boyadan kurtulan raportör floroforun ışınması tespit edilir. Her döngüde üretilen amplikon miktarına bağlı olarak cihaz tarafından tespit edilen sinyal şiddeti de artar.

PCR amplifikasyon eğrilerinde eksponansiyel, lineer ve plato fazı olmak üzere 3 safha gözlenir (Şekil 2.9.1). Eksponansiyel fazda reaksiyon verimi tamdır, ürünler geometrik olarak artar. Real-Time PCR'da değerlendirmeler bu fazda yapılır. Lineer fazda reaksiyon bileşenleri tükenmeye başlar ve reaksiyon yavaşlar. Plato fazında ise

reaktifler artık tükenmiştir, ürün yapımı durur. Real-Time PCR’da pozitif reaksiyon floresan sinyallerinin birikimi ile saptanır. Ct (Cycle threshold / Eşik döngü) değeri bu floresan sinyallerin eşik seviyeyi aştığı döngü sayısıdır. Ct değeri ile hedef nükleik asit miktarı arasında ters orantı vardır. Düşük Ct değerleri örnekte daha yüksek miktardaki hedef nükleik asit varlığını ifade eder.



Şekil 2.9.1. Real-Time PCR amplifikasyon eğrisi ve fazlar

Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği, mRNA ekspresyonu düzeylerinin kantitatif olarak saptanmasını ve ölçülmesini sağlayan oldukça hassas floresan tabanlı bir PCR teknolojisidir.

PCR (qPCR)

PCR (qPCR) tekniğinin dahil edilerek RT-PCR tekniğinin RNA kantitasyonunda kullanılmasına olanak sağlar. İlk aşama, revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA kalıplarının cDNA’ya dönüştürülmesi (RT-PCR) reaksiyonlarını içerir. İkinci aşama ise PCR amplifikasyonu (qPCR) ile ilgili reaksiyonları içerir. qRT-PCR’ın iki farklı uygulaması mevcuttur. Bu uygulamalardan biri, cDNA sentezinden PCR amplifikasyonuna kadar olan bütün reaksiyonların tek bir tüpte gerçekleştirilmesidir. İkinci uygulama ise iki aşamalı bir süreç olup, RT-PCR ve qPCR ayrı tüplerde gerçekleştirilir. Tek aşamalı reaksiyonda başlangıç RNA kalıpları yıkıma daha yatkındır. Ayrıca, tek aşamalı reaksiyon iki aşamalı reaksiyona göre daha az hassastır.

2.9.2.Gen Polimorfizm Belirleme Yöntemi

Gen polimorfizmleri (“single nucleotide polymorphisms”), genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir (154). Gen polimorfizminde kullanılan en yaygın yöntemlerden birisi hasta DNA örneği kullanılarak yapılan real time PCR uygulamalarıdır.

Polimorfizm analizi, geleneksel olarak polimeraz zincir reaksiyonu-bağlantılı restriksiyon fragment polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklılıklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır.

ROP hastalarında KDR gen polimorfizmi ilgili genin belirli ekzonunda mutasyona sebep olduğu bilinmektedir. Bu amaçla KDR gen polimorfizmi ile ilgili mutasyon belirlenmeye çalışıldı.

2.9.3. Gen Ekspresyonu Yöntemi

Bir hücrede gen anlatımı(ekspresyonu) olan her mRNA için oligonükleotid etiketleri (yaklaşık 10 baz boyunda) kullanılmakta ve bir seri işlemten sonra klonlanıp dizilenecek her bir ürün değerlendirilmektedir (155). Böylece her bir etiketli ürün bir mRNA'ya karşılık gelmekte ve etiketlerin sayısı da mRNA'nın miktarını vermektedir. Bu yöntem, dizisi bilinen genler için uygulanabilmektedir ve etiketlerin birbirleri ile benzeşmemesi önem taşımaktadır. İki farklı kaynaktan elde edilen gen anlatım verilerinin karşılaştırılmasına göre farklı eksprese edilen genlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır.

Gen ekspresyonunda kullanılan en yaygın yöntemlerden birisi hasta RNA örneği kullanılarak yapılan real time PCR uygulamalarıdır.

ROP hastalarında KDR gen ekspresyonunun hastalık oluşum sürecinde etkili olduğu ve endotel hücrelerin yüzey profilini etkilediği bilinmektedir. Bu amaçla KDR gen ekspresyonunun ölçülerek bireylerin hastalık eğiliminde bir etkisi olup olmadığı anlaşılmasına çalışıldı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TYL-2017-7276 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiş ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

Çalışma; Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı İmmün Yetmezlik Araştırma Laboratuvar'ına, yürütüldü. Hasta ve kontrol grubu Erciyes Üniversitesi Göz Hastalıkları ABD prematüre retinopatisi (ROP) polikliniğinde takip edilen ayaktan hastalar ve Pediatri ABD' yenidoğan servisinde kontrol altında bulunan 11 premature bebekten EDTA'lı tüplere alınan 2 mL periferik kan örnekleri ile yapıldı. Çalışma 2016/322 nolu ve 27.05.2016 tarihli etik kurul onayı çerçevesinde yürütüldü. Hasta ve kontrol örneklerinin ailelerinden araştırma için yazılı onay alındı.

3.1. Alet ve Cihazlar

Flow sitometrik analiz ve genetik analiz için kullanılan alet ve cihazlar;

1. Nüve NF800 model santrifüj cihazı,
2. Gilson pipet 1-10 µL, Socorex acura pipet 825 10-100 µL ve 100-1000 µL otomatik mikropipetler,
3. Vorteks cihazı (MRC SI-100),
4. Real Time PCR cihazı (LightCycler® 480 II- Roche Diagnostics GmbH)
5. Spektrofotometre (ThermoScientificNanoDrop 2000)
6. Termomikser cihazı (EppendorfThermoMixer C)
7. Termomikser cihazı (T-Shaker – EuroClone)
8. Plate santrifüj cihazı (CentrifugePerfectSpin P, Peqlab)
9. Santrifüj cihazı (Micro 200R HettichZentrifugen)
10. Derin Dondurucu (-20°Beko)

11. Distile Su Cihazı (Millipore Direct-Q 3 with UV)
12. Pyrosekans cihazı (PyroMark Q24 – QIAGEN)
13. PCR cihazı (Thermalcycler Labcycler- SensoQuest GmbH)
14. PCR cihazı (Thermalcycler T100™ ThermalCycler- Bio-Rad)
15. Real Time PCR cihazı (LightCycler® 480 II - Roche Diagnostics GmbH)
16. Spektrofotometre (ThermoScientificNanoDrop 2000)
17. Termomikser cihazı (EppendorfThermoMixer C)
18. Termomikser cihazı (T-Shaker – EuroClone)
19. Plate santrifüj cihazı (CentrifugePerfectSpin P, Peqlab)
20. Santrifüj cihazı (Micro 200R HettichZentrifugen)

3.1.1. Kitler ve Kimyasal Maddeler

Flow sitometrik analiz için yapılan çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal maddeler;

1. 10X Stem Cell Lysing Solüsyonu (BD Bioscience)
2. 10X FACS Lysing Solüsyonu (BD Bioscience)
3. 10X FACS Permeabilizing Solüsyonu (BD Bioscience)
4. CD31 FITC, CD146 PC5, CD144 PE, CD34 ECD/PC7, CD38 FITC / A750, CD116 PE, (Beckman Coulter, USA)
5. Beckman Coulter hücre yıkama solüsyonu (Beckman Coulter, USA)
6. CD45 KO (Beckman Coulter, USA)

Genetik analizde kullanılan kitler ve kimyasal maddeler;

7. High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
8. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
9. LightCycler® FastStart DNA MAster HybProbe (Roche)
10. Light SNP KDR Cys-482Arg rs34231037
11. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche)
12. EvoScript Universal cDNA Synthesis Kit (Roche)
13. RealTime ready Catalog Assays (Roche)
14. RealTime ready Designer Assays (Roche)
15. LightCycler® 480 Probes Master (Roche)

3.2 Akım Sitometrik Analiz Uygulamaları

3.2.1. Monositer Progenitör Hücrelerin Akım Sitometri ile Tanımlanması

Örneklerde lenfoid hücre dağılımı (T, B, NK) ile ayrıca monositik ve endotelial kök hücrelerdeki yüzey markırların ekspresyon düzeyi ve hücre sayıları hesaplandı. Çalışmada, CD31FITC, CD34 ECD/PC7, CD38 FITC / A750, CD116 PE, CD146 PC5 markırları kullanıldı.

Akım sitometri çalışmasına başlamadan önce solisyon ve kimyasallar hazırlandı.

Eritrositlerin lizisi: 10X FASC lizis çalışma solüsyonu hazırlanması; 1 birim FACS lizis stok solüsyonu / 9 birim distile su ile karıştırılarak lizis çalışma solüsyonu elde edildi. Eritrositlerin lizisi amacıyla kullanıldı.

3.2.1.1. Akım Sitometri Örnek Hazırlama İşlem Basamakları;

1. Her bir kontrol ve hastadan alınan 300 µL kan örneği ayrı flow tüplerine eklendi.
2. Her bir örnek için 2 flow tüpü kullanıldı. 1. Tüpe; CD31FITC, CD34 ECD, CD38 A750, CD146 PC5, markerları 5 'er µL eklendi. 2. Tüpe ise; CD45 KO, CD34 PC7, CD38 A750, CD116 PE 5 'er µL eklendi. Her bir örnek sayısı kadar flow tüpünde hazırlandı. Solüsyonun tam karışabilmesi için iyice vortekslendi. 20 dk inkübasyon işlemi uygulandı.
3. Her bir örnekten alınan 300 µL kan örneği üzerine 10 kat dilüe lizis solüsyonundan 2 mL eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Süre sonunda tüm örneklere 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem üç kez tekrarlandı.
6. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı.
7. Analiz, Beckman Coulter Navios model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak yapıldı.
8. Kullanılan 2 tüpteki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ayarları yapıldı ve FL1' de kompanzasyon sıfır olarak seçildi ve okuma 1.000.000 hücre sayımı ile yapıldı.

9. Akım sitometrik analiz sonrasında hematopoetik ve endotel kök hücreler seçilerek floresan yoğunluk histogram olarak gösterildi. Histogram görüntülerinde geometrik ortalama değerleri hesaplanarak SI değerleri elde edildi.

10. Kullanılan kontroller için de aynı işlem basamakları kullanıldı.

3.2.2. Hasta Örnekleri ve Kontrollerde İmmatür Monosit Sayısının Akım Sitometri ile Hesaplanması

Bu amaçla her bir kan örneğinden 1 milyon (1×10^6) hücre akım sitometri cihazında saydırıldı. Bu sayıdaki hücre içerisinde mevcut olan endotel kök hücre/monositik öncü hücre oranı kapılama yapılarak sayı olarak hesaplandı.

3.2.2.1. İmmatür Monosit/Endotel Kök Hücre Sayısının Hasta ve Kontrollerde Hesaplanması

CD116⁺ immatür hücre sayısı için; Hem hasta hem de kontrol örneklerinde aynı şekilde kapılama yapıp toplam hücre sayısından CD116 pozitif hücre değerleri verildi. Analiz ekranında CD116/SS grafiğinde (plotunda) SS grafiğinde 10^0 ve 10^3 arasındaki CD116⁺ hücreler kapılanıp, değerler toplam hücre sayısına göre verildi.

CD31⁺ hücre sayısı için; CD31/SS grafiğinde(plotunda) SS grafiğinde 10^0 ve 10^3 arasındaki CD31+ hücreler kapılanıp toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

CD34⁺ hücre sayısı için; CD34⁺ hücre değeri verilirken, CD45 dimdeki lenfositler kapılanır ve CD34/SS grafiğinde lenfosit kapısı seçildi. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp ve toplam hücre sayısına göre değer verildi.

CD38⁺ hücre sayısı için; CD45 dimdeki lenfositler kapılanıp CD34/SS grafiğinde lenfosit kapısı seçildi. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34+ hücre alanı kapılanıp CD38/SS grafiğinde CD34 kapısı seçilip CD34⁺ hücrelerin içindeki CD38⁺ hücrelerin toplam hücre sayısına göre değeri verildi.

CD146⁺ hücre sayısı için; CD45 dimdeki lenfositler kapılanır ve CD34/SS grafiğinde lenfosit kapısı seçildi. Daha sonra CD34/SS ekranındaki CD34⁺ hücre alanı kapılanıp CD146 /SS grafiinde CD34 kapısı alınıp CD34⁺ hücreler içinden CD146⁺ hücre değeri bulunup toplam hücre sayısına göre değer verildi.

3.3. Polimorfizm Çalışması

3.3.1. DNA izolasyonu

Kandan genomik DNA eldesi için High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılmıştır.

Hasta (10) ve Kontrol grubu (8) 'den EDTA'lı tüpe 2 ml periferik kan alınmıştır ve DNA eldesi için aşağıda sıralanan aşamalar uygulanmıştır.

Liyofilize haldeki Proteinaz K'ya 5 ml distile su ilave edildi. Inhibitör Removal Buffer 20 ml etanol eklenerek, yıkama solüsyonu (wash buffer) 80 ml etanol eklenerek hazırlandı. Ön hazırlık aşamasından sonra aşağıdaki işlem sıralaması uygulandı;

1. 1,5 ml lik ependorf tüplere 200 µl kan örneği alındı.
2. Üzerlerine 200 µl Binding Buffer ve 40 µl Proteinaz K eklenerek iyice karıştırıldı.
3. Karışım 10 dakika 70 °C'de inkübasyona bırakıldı.
4. DNA çöktürmesini sağlamak için, daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle karıştırıldı.
5. Hasta sayısı kadar toplama tüpü çıkartıldı ve her birine filtreli tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım toplama tüplerine aktarıldı.
6. Tüplerdeki karışım 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
8. Her tüpe 500 µl inhibitör removal buffer eklendi ve 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
9. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
10. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
11. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine alındı.
12. Her tüpe 500 µl yıkama solüsyonu (wash buffer) eklendi ve 8000x g' de 1 dk santrifüj edildi.
13. Toplama tüplerindeki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g' de 10 saniye karıştırıldı.
14. Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml' lik ependorf tüplerine alındı.
15. Her tüpe önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 70 °C'de bekleyen elution buffer dan 200 µl eklendi.
16. Ependorf tüplerindeki karışım 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.

17. Elde edilen DNA örneklerini nano drop ta konsantrasyonu ölçüldü her bir örneğin üzerine yazıldı.

18. DNA örnekleri sonra çalışılmak üzere -20 derecede saklandı.

3.3.2. Real-Time-PCR Kiti ile KDR Gen Polimorfizmi Analizi

Çalışma Real-Time PCR sisteminde FastStart DNA Master HybProbe kullanılarak yapılmıştır. DNA örneği Amplikon PCR döngüsünün annealing basamağında hibridize olan spesifik problemler kullanılarak floresan ışıkla belirlenmiştir.

Reaksiyon karışımı hazırlanmadan önce LightCycler® 480 cihazı açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Daha sonra sisteme çalışılacak polimorfizmlerinin analizinde kullanılacak olarak protokol yüklendi. Hasta listesi girişi yapıldı ve sistem çalışma için hazır duruma getirildi. Reaksiyon karışımı için gerekli olan reaksiyon karışımı ve kontrol solüsyonu aşağıdaki işlem basamakları uygulanarak hazırlandı.

Kit kullanılmaya kadar -20°C’de bekletildi. Malzeme tekrar tekrar dondurup çözme işlemlerinden uzak tutuldu.

PCR Master karışımları hazırlanmaya başlanmadan önce LightCycler® 480 açıldı ve cihazın self-test yapması sağlandı. Cihaza aşağıdaki PCR programı yüklendi (Tablo 3.3.2).

PCR miksi aşağıdaki miktarlar eklenerek hazırlandı;

1. LightCycler® Fast-Start Enzim (1a) ve Fast-Start Reaksiyon Karışımı Hyprobe (1b) karıştırıldı ve karışıma LightCycler® Fast-Start DNA Master Hyprobe yeni ismi etiketlendi.

Tablo 3.3.2. Polimorfizm analizi için Master PCR karışımı

Bileşenler	Miktarları
LightCycler® Fast-Start DNA Master Hyprobe	2 µl
MgCl ₂ stok solüsyonu (Mavi Kapak)	1,6 µl
SNP Primer/Probe	1 µl
PCR-grade su (renksiz kapak)	13,4 µl
Toplam Hacim	18 µl

2. 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde reaksiyon sayısına göre çizelgede verildiği Şekilde reaksiyon miksi hazırlandı. İçinde master miksin bulunduğu 1B (beyaz renkli kapak) tüpünün tamamı içerisinde FastStart enzimin bulunduğu 1A (kırmızı renkli kapak) tüpüne aktarılır. Bu karışım hafif el hareketleriyle karıŐtırıldıktan sonra spin yapıldı.
3. Platedeki her kuyucuğa 18 l reaksiyon karışımı dağıtıldı.
4. Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildi. Hava kabarcığı oluŐmuŐsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
5. Her çalışmada bir negatif ve bir pozitif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol için ilk kuyucuğa 2  l PCR grade su, pozitif kontrol için ise son kuyucuğa daha önceden çalıŐtıĐını bildiğimiz DNA örneğinden 2  l eklendi.
6. Diğer kuyucuklara analiz edilecek örnekler sırasıyla 2'Őer  l dağıtıldı.
7. Platedeki kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı tekrar kontrol edildi. Hava kabarcığı oluŐmuŐsa plate uygulanan vibrasyon hareketiyle meydana gelen hava kabarcığı yok edildi.
8. Platelere'ın  zeri LightCycler 480 sealing foil ile sıkıca kapatıldı.
9. Platelere 1000rpm de 10 sn santrifüj edildikten sonra aşağıdaki SNP PCR programında LightCycler 480 cihazına yüklendi (Tablo 3.3.2.1).

Tablo 3.3.2.1. Polimorfizm analizi için PCR ısı döngüleri ve süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık geçiş oranı(°C/sn)
Denatürasyon	1	95°C	10 dk	4,4
Amplifikasyon	45	95°C	10sn	4,4
		60°C	10 sn	2,2
		72°C	15 sn	4,4
Erime Eğrisi Analizi	1	95°C	30 sn	4,4
		40°C	2 dk	1,5
		75°C	-	0.2
Soğuma	1	40°C	30sn	1,5

10. Analiz işlemi, 45 döngü sonunda LightCycler®480'e ait 2 versiyonda analiz programı kullanılarak yapıldı.

11. Tm (melting temperature)'deki +/- 1.5°C'lik sapmalar kabul edildi.

12. Sonuçlar değerlendirildi.

3.4. Hasta ve Kontrol Örneklerinde Ekspresyon Çalışması

Periferik Kandan RNA Eldesi: Hastaların RNA'ları, periferik kandan High Pure RNA Isolation Kit ile izole edildi. RNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler ve işlem basamakları aşağıda verilen şekilde uygulandı.

Kimyasal Maddeler

High Pure RNA Isolation Kit (Roche) kit madde ve içerikleri verilmiştir. (Tablo 3.4)

Tablo 3.4. RNA izolasyonu kimyasal madde içerikleri

Madde	İçerik
Lysis/-Binding Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25ml • (4.5M guanidine-HCl, 50mM Tris-HCl, 30% Triton X-100w/v, PH 6.6(25°C))
Dnase I	<ul style="list-style-type: none"> • 10 KU lyophilized Dnase I • Resuspend in 0.55 ml Elution buffer)
Dnase Incubation Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 10ml • 1M NaCl, 20mM Tris-HCl ve 10mM MnCl₂, PH 7.0 (25°C)
Wash Buffer I	<ul style="list-style-type: none"> • 10ml • 20ml Ethanol eklendi • 5M guanidine hydrochloride ve 20mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C)
Wash Buffer II	<ul style="list-style-type: none"> • 10ml • 40ml Ethanol eklendi • 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, PH 7.5(25°C)
Elution Buffer	<ul style="list-style-type: none"> • 30ml • Su, PCR grade

Kullanılan ek malzemeler: RED-CELL lysis solisyonu, 10XPBS solution

3.4.1. Gen Ekspresyon Çalışması İşlem Basamakları

Çalışmaya başlamadan önce solüsyon ve kimyasallar hazırlandı.

RED-CELL lysis solisyonunun hazırlanması; 2 lt için 16.4gr Ammonium chlorid, PH'ı 8 %99,5 'lik 4mL EDTA, 2 lt için 2 gr Potassium bicarbonate eklenip mix karışımı yapıldı.

1. Her bir örnek için 15ml 'lik falkon tüplere 1ml periferik kan'ın üzerine 3ml RED-Cell lysis solisyonu eklendi. 10dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 500 x g de 5 dk santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası üst faz döküldü ve üzerine tekrar RED-Cell lysis solisyonu eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 500 x g de

5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz alındı ve kalan pellet kolonlara aktarıldı üzerine 200ml PBS eklenerek çözdürüldü.

3. Çözdürülen örneklerin üzerine 400µL Lysis/-Binding buffer eklenerek 15 sn vortekslendi ve 8000 x RCF/g 'de 15 sn santrifüj edildi.

4. Kolondaki sıvı döküldü. Steril bir ependorf tüpe; Hasta başı 90 µL Dnase inkübasyon buffer ve 10 µLDnase I 'den mix karışımı oluşturuldu. Homojen bir karışım elde etmek için karışım vortekslendi. Her hasta için 100' er µL eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.

5. Süre sonunda bekletilen örneklerin üzerine 500µL Wash Buffer I eklenerek 8000x RCF/g 'de 15sn santrifüj edildi. Kolonda kalan sıvı döküldü.

6. Kolon üzerinde kalan filtrenin üzerine 500 µL Wash Buffer II eklenerek 8000x RCF/g 'de 15sn santrifüj edildi. Kolonda kalan sıvı döküldü. Bu işlem 200 µL Wash Buffer II eklenerek 13000x RCF/g 'de 2 dk santrifüj edilmek için tekrarlandı. Aynı işlem hiçbir madde eklenmeden bir kez daha tekrarlandı (13000x RCF/g 'de 2 dk santrifüj).

7. Son olarak hazırlanan ependorf tüplerin üzerine filtreler yerleştirildi ve 50 µL Elution Buffer eklenip 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 8000x RCF/g 'de 1dk santrifüj edildi.

8. Ependorf tüplerde kalan sıvı RNA 'dır. Çalışma için kullanılmak üzere -80°C' de muhafaza edildi.

3.4.2. Elde Edilen Total RNA Saflığının Ölçülmesi

İzole edilen RNA örnekleri, NanoDrop Scientific™ 1000 (cihazı ile ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik dansitesinden (OD), saflığı da 260nm / 280nm'deki OD oranından saptandı. RNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtildi.

RNA konsantrasyonu (ng / µl): OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA saflığı: OD 260 / OD 280 ≥ 2.0

OD 230/260 ≥ 2.0

Birinci Normalizasyon: Çalışmamızda cDNA sentezi için gerekli her bir RNA örneğinin konsantrasyonu reaksiyon başına 1 µg olacak şekilde eşitlendi.

3.4.3. qRT-PCR ile KDR Gen Ekspresyonu ölçümü

Bizim çalışmamızda, aday genimizin ekspresyon düzeyini iki basamaklı qRT-PCR reaksiyonunu kullanarak belirlendi.

RT-PCR cDNA Sentezi:

RT-PCR tekniğinde, ters transkriptaz enzimi kullanılarak RNA kalıpları cDNA'ya dönüştürülür. Çalışmamızda kalıp RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi, cDNA sentez kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- RNA'lar son konsantrasyonları 2.5µg olacak şekilde (Tablo 3.4.3)'de gösterildiği gibi primer ve kalıp RNA karışımı PCR tüplerinde hazırlandı.

Tablo 3.4.3. cDNA sentezi için kalıp RNA ve primer karışımı (1 reaksiyon için)

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
RNA	Değişken	2.5 µg
Random Hexamer Primer, 600 pmol/ µl	4µl	60 µM
dH ₂ O	Değişken	Toplam hacim 18 µl olacak şekilde tamamlanır.
Toplam Hacim	18µl	

- Kalıp – primer karışım tüpleri denatürasyon için 65°C'de 10 dakika bekletildikten sonra tüpler hemen buz üzerine alınıp soğutuldu.
- Kalıp – primer karışımını içeren tüplere revers transkripsiyon için kalan bileşenler (Tablo 3.4.3.1)'de belirtilen miktarlarda eklendi.

Tablo 3.4.3.1. Revers transkripsiyon karışımı bileşenleri

Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonu
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc.	4 µl	1x (8mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor, 40U/µl	0.5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10mM	2 µl	1mM
DTT	1 µl	5mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1 µl	10U
Toplam Hacim	8.6 µl	
Final Hacim	20 µl	

- Tüpler PCR cihazına konuldu ve 10 dakika 29°C’de, 60 dakika 48°C’de inkübe edildi (Tablo 3.4.3.2).

Tablo 3.4.3.2. cDNA sentezi için gerekli sıcaklık döngüsü

Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)
42°C	15
85°C	5
65°C	15
4°C	∞

- İnkübasyon sonrası örnekler hemen buz üzerine alındı ve -20°C’de saklandı.

Ekspresyon Analizi

Ekspresyon çalışması LightCycler® 480 II cihazı ile yapıldı. Analizler LightCycler® 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapıldı. Her örnek bir kez çalışıldı. Her bir çalışmada 1 adet negatif kontrol ve bir kalibratör kullanıldı.

Çalışmada gene özgü RealTime ready Catalog (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Almanya) primer-prob kitleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin dizileri verilmiştir.

<i>KDR</i> geni için primer dizisi	140360	F: GAAAAGACATTGCGTGGTCA R: TCCAGGTTTCCTGTGATCGT
------------------------------------	--------	--

- LightCycler® 480 Probes Master kullanılarak (Tablo 3.4.3.3)'e göre Real-Time PCR karışımı hazırlandı.

Tablo 3.4.3.3. Ekspresyon analizi için prob master PCR karışımı

Bileşenler	Hacim (1 Reaksiyon)
LightCycler® 480 Probes Master	10µl
RealTime ready Assays	1µl
dH ₂ O	4µl
Toplam hacim	15µl

- Hazırlanan karışım 96'lık LightCycler® 480 Multiwell Plate'in her bir kuyucuğuna 15'er µl dağıtıldı.
- 1:40 oranında dilüe edilen cDNA'lar her bir kuyucuğa 5'er µl eklendi.
- Multiwell Plate'in üzeri optik bantla sıkıca kapatıldı.
- Plate perfectspin ile santrifüj yapıldıktan sonra plate cihaza yüklendi.

LightCycler® 480 Software açılarak (Tablo 3.4.3.4)'deki programa göre çalışma başlatıldı.

Tablo 3.4.3.4. Ekspresyon analizi için ayarlanan sıcaklık ve süreler

	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık artış-azalış hızı (°C/sn)
Preinkübasyon	1	95°C	10 dk	4.4
Amplifikasyon	45	95°C	10sn	4.4
		60°C	30sn	2.2
		72°C	1sn	4.4
Soğuma	1	40°C	30sn	2.2

Rölatif Kantitasyon (Kontrol Geni):

Rölatif kantitasyon yönteminde hedef genin konsantrasyonu başka bir referans gene oranlanarak hesaplanır. Rölatif kantitasyon yöntemleri başlangıç örnek miktarından, cDNA sentez verimliliğinden ya da pipetleme hataları gibi faktörlerinden etkilenmez. Kullanılacak referans gen tüm hücrelerde eksprese olan, hücre canlılığı için gerekli, hücre içindeki değişimlerle ekspresyon düzeyi değişmeyen özellikte olmalıdır. Bu özellikteki genlere “House Keeping Genler” de denir. GAPDH, ACTB (β -Actin), HPRT ve TBP referans genlere örnek olarak verilebilir. Rölatif kantitasyon yönteminde kullanılan kalibratör sayesinde prob birleşimindeki farklılıklar, FRET verimi ya da boya eksitasyon sabitleri gibi saptama farklılıkları düzeltilir.

Bu çalışmada, hedef gen olarak VEGFR-2 (KDR), referans gen olarak β -Actin ile çalışıldı. Bütün hastalarda her gen ayrı ayrı çalışıldı. LightCycler® 480 software programından Ct değerleri ve normalize değerler elde edildi.

3.5. Verilerin Analizi

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İkili gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Mann Whitney- U testi ve T testleri kullanıldı. Nicel veriler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Verilerin analizi Turcosa Cloud (Turcosa Ltd Co) istatistik yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Uygulanan Testlerin Optimizasyonu

4.1.1. Akım sitometrik çalışmaların optimizasyonu

Bu çalışma yöntem kısmında anlatılan protokole göre çalışıldı. Kan örnekleri alındığı andan itibaren fazla beklemediği için hücrelerin canlılığında bir sorun yoktu ve akım sitometride 1.000.000(1×10^6) hücre sayımı ile analiz yapıldı. Analiz yapılırken cihazın her iki lazeride kullanıldı ve yapılan akım sitometrik incelemelerde CD45, CD31 CD34, CD116, CD146 ekspresyonları ölçüldü. Ayrıca sadece CD31, CD34, CD116, CD146 eksprese eden immatür hücre sayıları kapılama yapılarak hesaplandı.

4.1.2. Gen ekspresyon ve mutasyon çalışmalarının optimizasyonu

Primerlerin çalışıp çalışmadığı pozitif ve negatif kontrol kullanılarak sağlıklı örneklerle test edildi. Real time uygulamasının çalıştığı ve kitlerin fonksiyonel olduğu b aktin çalışması ile doğrulandı. Özel hazırlanan mutasyon tarama kiti ile sağlıklı kontrollerde uygulaması yapılarak optimizasyon sağlandı.

4.2. Çalışmada Kontrol Grubu:

Çalışmada yer alan herbir kontrol grubu ailesinden gerekli izinler alınarak 2 cc kan örneği alındı ve akım sitometrik analiz ve genetik analiz bu örneklerle yapıldı. Kontrol örnekleri üçü kız, beşi ise erkek olmak üzere 8 prematüre yenidoğan bebekten alındı. Ortalama yaş 35 ± 2 'dir. Kontrol grubundaki kişilerin özellikleri (Tablo 4.2)' de verildi.

Tablo 4.2. Kontrollerin doğum haftası, doğum kilosu ve cinsiyet durumu

Kontrol Grubu	Doğum Haftası	Doğum kilosu	Cinsiyet
Kontrol 1	38	1100	Kız
Kontrol 2	37	1570	Erkek
Kontrol 3	38	1200	Erkek
Kontrol 4	36	855	Kız
Kontrol 5	35	1210	Kız
Kontrol 6	38	1680	Erkek
Kontrol 7	35	1500	Erkek
Kontrol 8	35	1800	Erkek

4.2.1 Çalışmadaki ROP Hasta Grubu

Çalışmada yer alan herbir hasta ailesinden gerekli izinler alınarak 2 cc kan örneği alındı ve akım sitometrik analiz ve genetik analiz bu örneklerle yapıldı. Hasta örnekleri üçü kız, sekizi erkek olmak üzere 11 premature yenidoğan bebekten alındı. Hastaların grubundaki kişilerin özellikleri (Tablo 4.2.1)' de verildi.

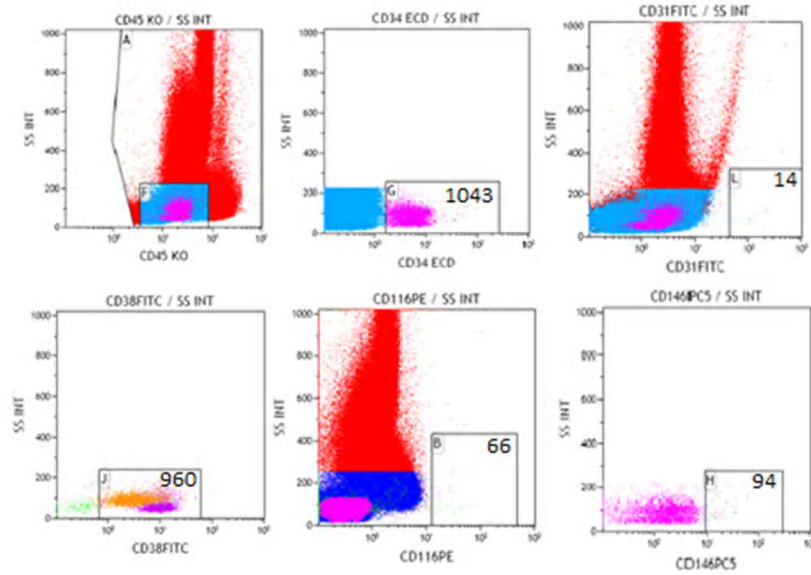
Tablo 4.2.1. ROP Hastaların doğum haftası, doğum kilosu, cinsiyeti durumu.

Hasta Grubu	Doğum Haftası	Doğum kilosu	Cinsiyet
Hasta 1	37	685	Erkek
Hasta 2	36	1900	Erkek
Hasta 3	38	1530	Erkek
Hasta 4	34	920	Erkek
Hasta 5	34	825	Erkek
Hasta 6	35	1930	Kız
Hasta 7	35	920	Erkek
Hasta 8	29	970	Kız
Hasta 9	31	950	Kız
Hasta 10	27	825	Erkek
Hasta 11	25	870	Erkek

4.3. Akım sitometri ile Monositer/ Endotelyal Progenitör Hücrelerin Analizi

4.3.1. Kontrol Grubunda Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Çalışmaya katılan kontrol örneklerinin her birinde akım sitometri ile bir milyon hücre sayımı yapıldı. Kapılamalar yapılarak CD31, CD34, CD38, CD116 ve CD146 pozitif hücre sayıları hesaplandı. CD34⁺ hücre sayısının kontrol grubundaki ortalama değeri 2498, CD31⁺ hücre sayısının kontrol grubundaki ortalama değeri 15, CD38⁺ hücre sayısının kontrol grubundaki ortalama değeri 2410, CD116⁺ hücre sayısının kontrol grubundaki ortalama değeri 54, CD146⁺ hücre sayısının kontrol grubundaki ortalama değeri 88 olarak bulundu (Tablo 4.3.1). Kontrol grubunda K1 nolu kontrolün akım sitometrik kapılama ile monositer/endotelyal progenitör hücre sayıları verilmiştir (Şekil 4.3.1).



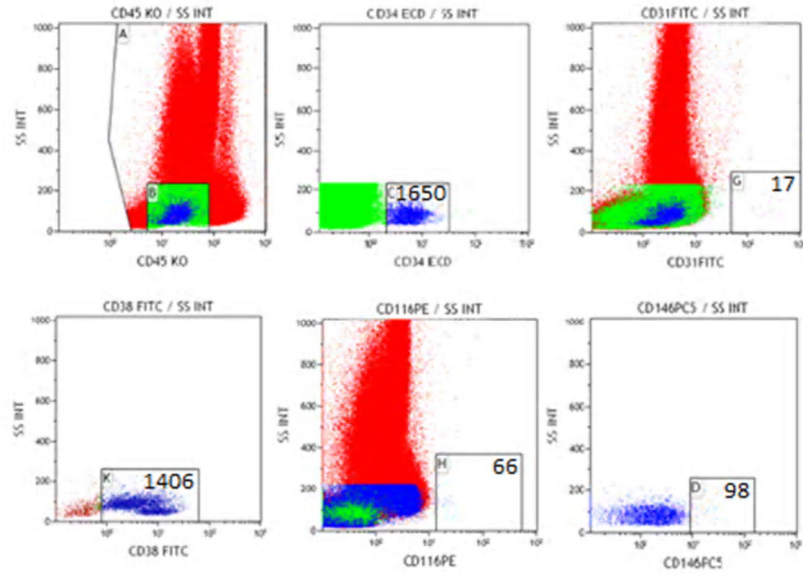
Şekil 4.3.1. Kontrol grubunda K1 nolu kontrolün akım sitometrik kapılama ile monositer/ endotelyal progenitör hücre sayılarının gösterimi

Tablo 4.3.1 Kontrol grubunda akım sitometri analiz sonuçları ve hücre sayıları

Kontrol Grubu	Çalışılan antikorlar ile bir milyon (1×10^6) öççülen hücre sayıları				
	CD31	CD34	CD38	CD116	CD146
Kontrol 1	14	1043	960	66	94
Kontrol 2	5	1282	1107	50	99
Kontrol 3	10	4345	4980	47	89
Kontrol 4	25	2002	1530	66	92
Kontrol 5	8	4384	4877	66	85
Kontrol 6	12	4023	3885	40	70
Kontrol 7	26	1514	1.332	46	92
Kontrol 8	21	1032	609	49.5	82
Ortalama Değerleri	15	2489	2410	54	88

4.3.2. Hasta Örneklerinde Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

Çalışmaya katılan hasta örneklerinin her birinde akım sitometri ile bir milyon hücre sayımı yapıldı. Kapılamalar yapılarak CD31, CD34, CD38, CD116 ve CD146 pozitif hücre sayıları hesaplandı. CD34⁺ hücre sayısının hasta grubundaki medyan değeri 2704, CD31⁺ hücre sayısının hasta grubundaki medyan değeri 18, CD38⁺ hücre sayısının hasta grubundaki medyan değeri 2338, CD116⁺ hücre sayısının hasta grubundaki medyan değeri 55, CD146⁺ hücre sayısının hasta grubundaki medyan değeri 79 olarak bulundu (Tablo 4.3.2). Hasta grubunda H1 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile monositer/endotelyal progenitör hücre sayıları verilmiştir (Şekil 4.3.2).

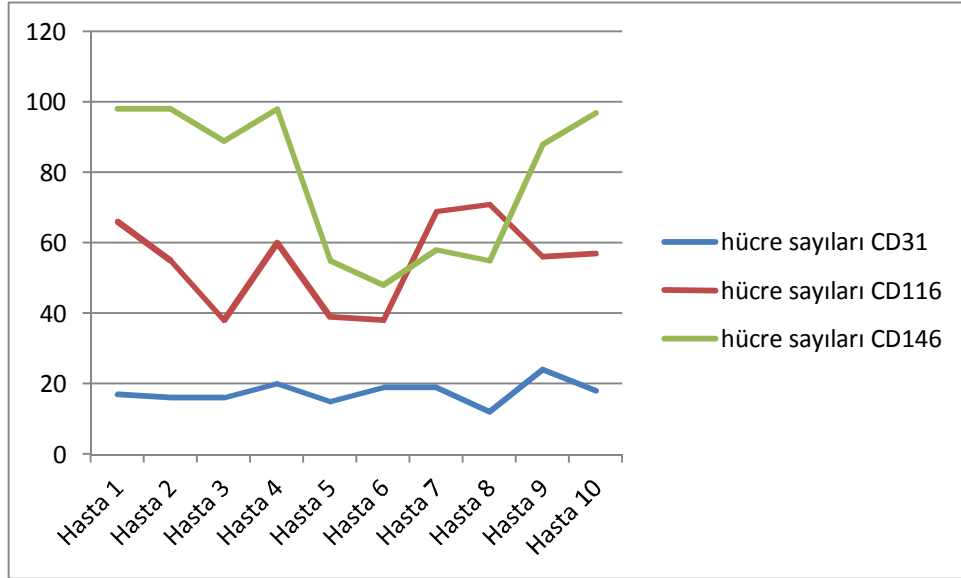


Şekil 4.3.2. Hasta grubunda H1 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile monositer/ endotelial progenitör hücre sayılarının gösterimi

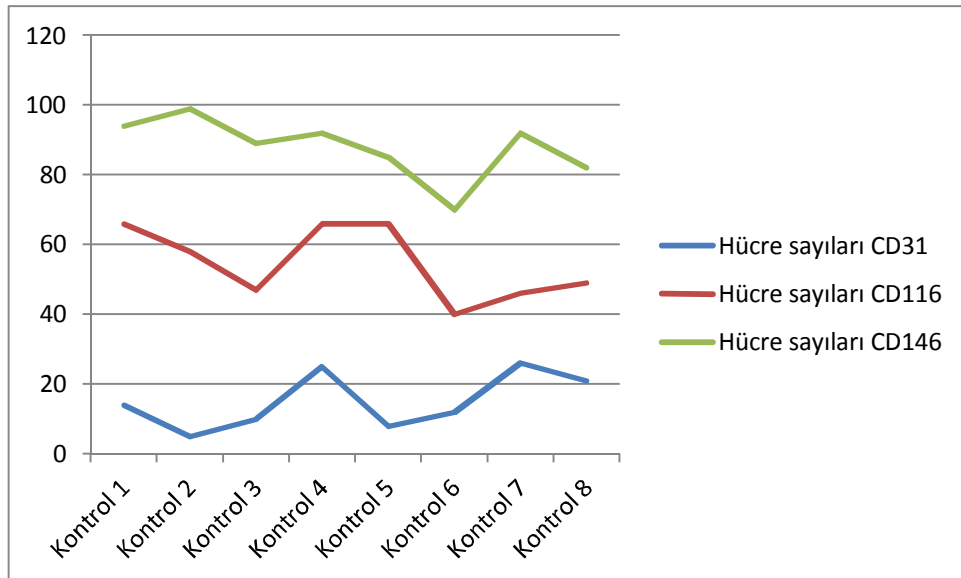
Tablo 4.3.2. Hasta grubunda akım sitometri analiz sonuçları ve hücre sayıları

Hasta Grubu	Çalışılan antikorlar ile bir milyon (1×10^6) öçülen hücre sayıları				
	CD31	CD34	CD38	CD116	CD146
Hasta 1	17	1650	1406	66	98
Hasta 2	16	3391	3082	55	98
Hasta 3	16	3171	2998	38	89
Hasta 4	20	1720	1060	60	98
Hasta 5	15	1384	1306	39	55
Hasta 6	19	3954	2625	38	48
Hasta 7	19	1733	1625	69	58
Hasta 8	12	5047	4990	71	55
Hasta 9	24	2628	2032	56	88
Hasta 10	18	2369	2265	57	97
Ortalama Değerleri	18	2704	2338	55	79

Hasta ve kontrol grubunda akım sitometri ile yapılan CD31⁺, CD116⁺, CD146⁺ yüzey markırlarının hücre sayılarının hastalara göre dağılımı (Şekil 4.3.3) ve (Şekil 4.3.4)'de verilmiştir.



Şekil 4.3.3. ROP hastalarının akım sitometri ile yapılan CD31⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre sayılarının hastalara göre dağılımı



Şekil 4.3.4. Kontrol grubunun akım sitometri ile yapılan CD31⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre sayılarının kontrollere göre dağılımı

4.3.3. Hasta ve Kontrol Grubunda İmmatür Hücrelerin Medyan Değerlerinin Karşılaştırılması

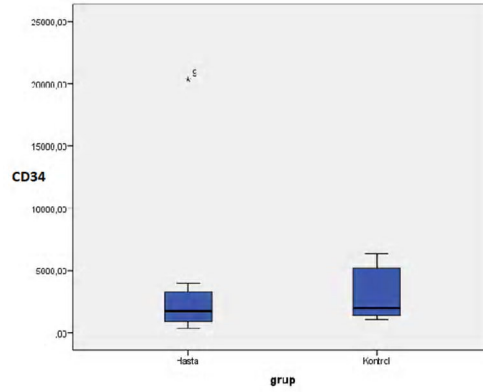
Hasta ve kontrol grubunda CD31⁺, CD34⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ markırlarının pozitif hücre sayılarının medyan değerlerinin gruplara göre karşılaştırması (Tablo 4.3.3) 'de verilmiştir.

Tablo 4.3.3. İmmatür monositer hücre sayılarının karşılaştırması

Hücre yüzey markırları	Gruplara göre markır pozitif hücre sayılarının medyan değerleri		<i>p</i>
	Hasta (n=11)	Kontrol (n= 8)	
CD34	1720	2002	0.425
CD31	17	12	0.479
CD38	1406	1530	0.999
CD116	56	49	0.860
CD146	88	85	0.791

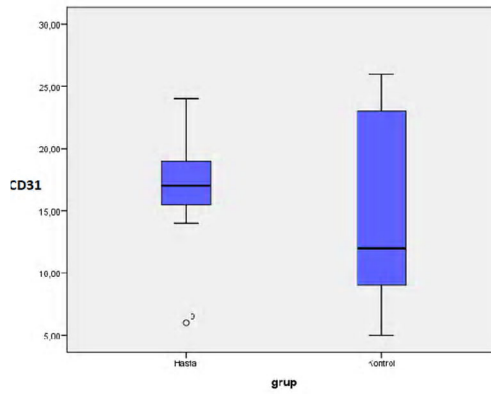
Veriler ortanca değer olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

CD34⁺ hücrelerin medyaan değeri hastalarda 1720 kontrollerde ise 2002 hücre olarak bulundu (Tablo 4.3.3). CD34⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (Şekil 4.3.5)' de verilmiştir ($p:0.425$).



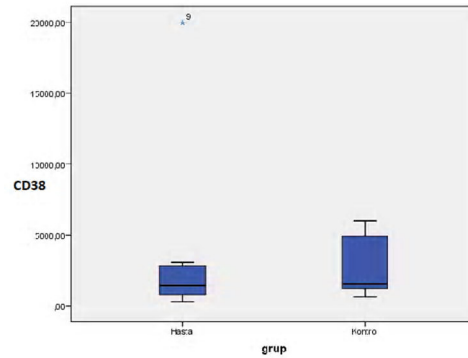
Şekil 4.3.5. CD34⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (p: 0.425)

CD31⁺ hücrelerin medyan değeri hastalarda 17 hücre kontrol grubunda ise 12 hücre olarak bulundu (Tablo 4.3.3). CD31⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (Şekil 4.3.6)' de verilmiştir (p: 0.479).



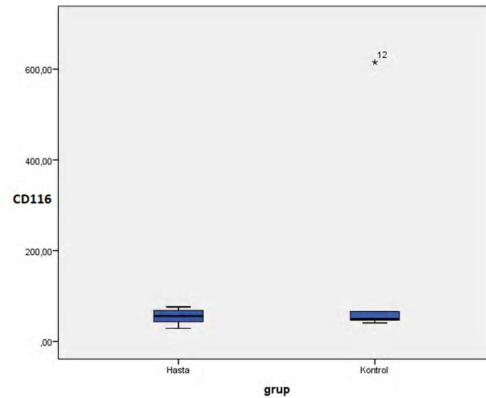
Şekil 4.3.6. CD31⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (p: 0.479)

CD38⁺ hücrelerin medyan değeri hastalarda 1406 hücre kontrol grubunda ise 1530 hücre olarak bulundu (Tablo 4.3.3). CD38⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubundamedyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (Şekil 4.3.7)' de verilmiştir (p: 0.999)



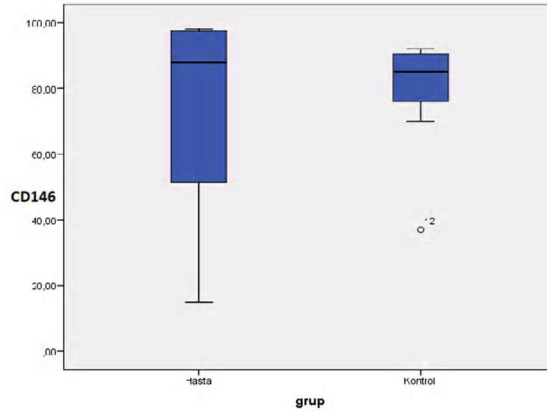
Şekil 4.3.7. CD38⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (p: 0.999)

CD116⁺ hücrelerin medyan değeri hastalarda 56 hücre kontrol grubunda ise 49 hücre olarak bulundu (Tablo 4.3.3). CD116⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel karşılaştırmalı grafiği (Şekil 4.3.8)' de verilmiştir (p: 0.860).



Şekil 4.3.8. CD116⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel karşılaştırmalı grafiği (p: 0.860)

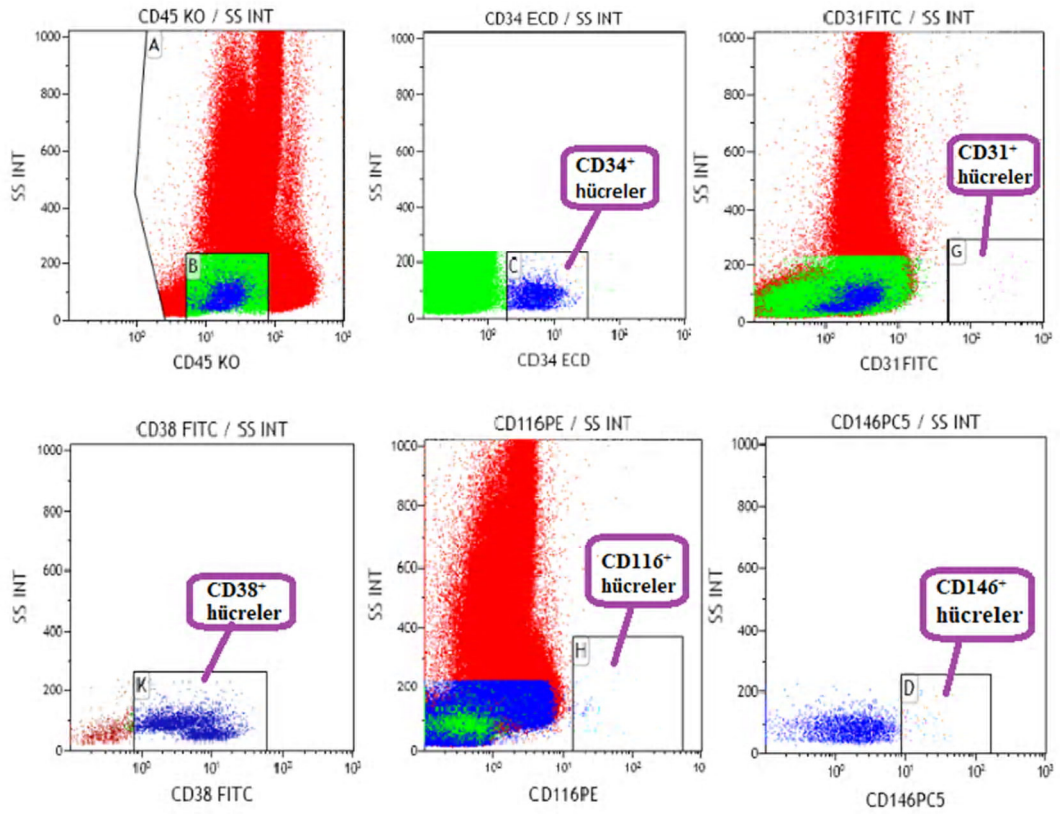
CD146⁺ hücrelerin medyan değeri hastalarda 88 hücre kontrol grubunda ise 85 olarak bulundu (Tablo 4.3.3). CD146⁺ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (Şekil 4.3.9)' de verilmiştir (p: 0.791).



Şekil 4.3.9. CD146+ hücre değerinin hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı grafiği (p: 0.791)

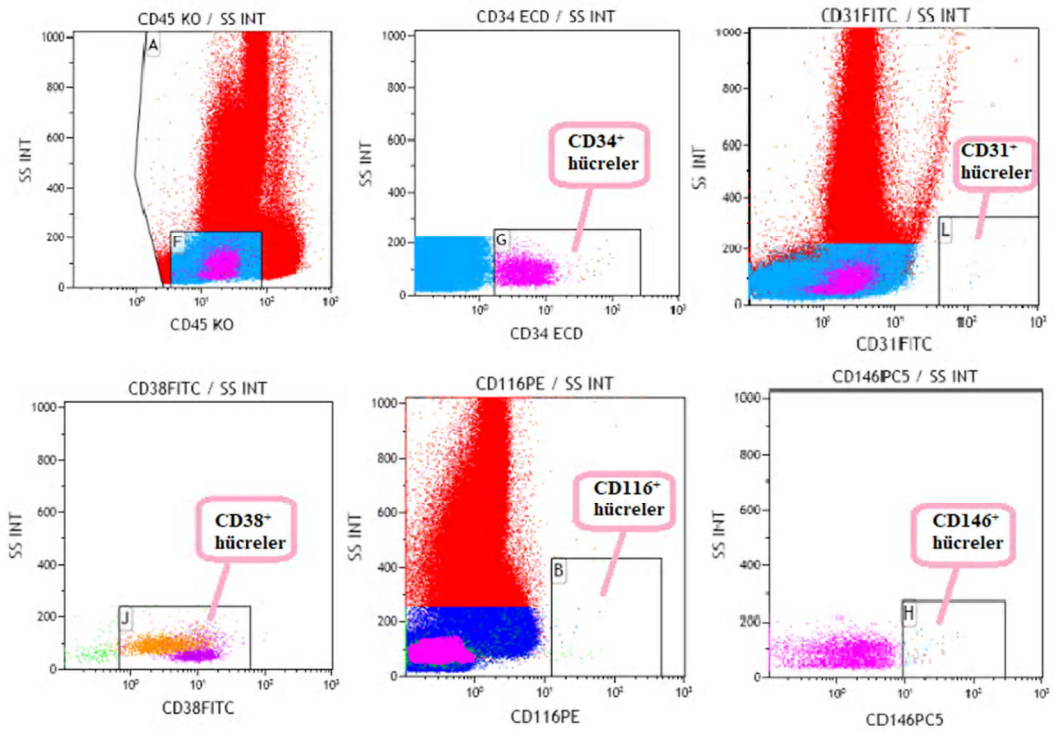
4.4. ROP Hastaları ve Kontrollerin Akım Sitometrik Analizde Elde Edilen Hücre Sayılarının Karşılaştırılması

ROP hasta grubunda CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre popülasyonu değerleri uygun kaplamalar yapılarak değerlendirildi. Örnek teşkil etmesi için hasta grubundaki CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü gösterildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. ROP hasta grubundaki H1 nolu hastanın akım sitometrik kapılama ile CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü

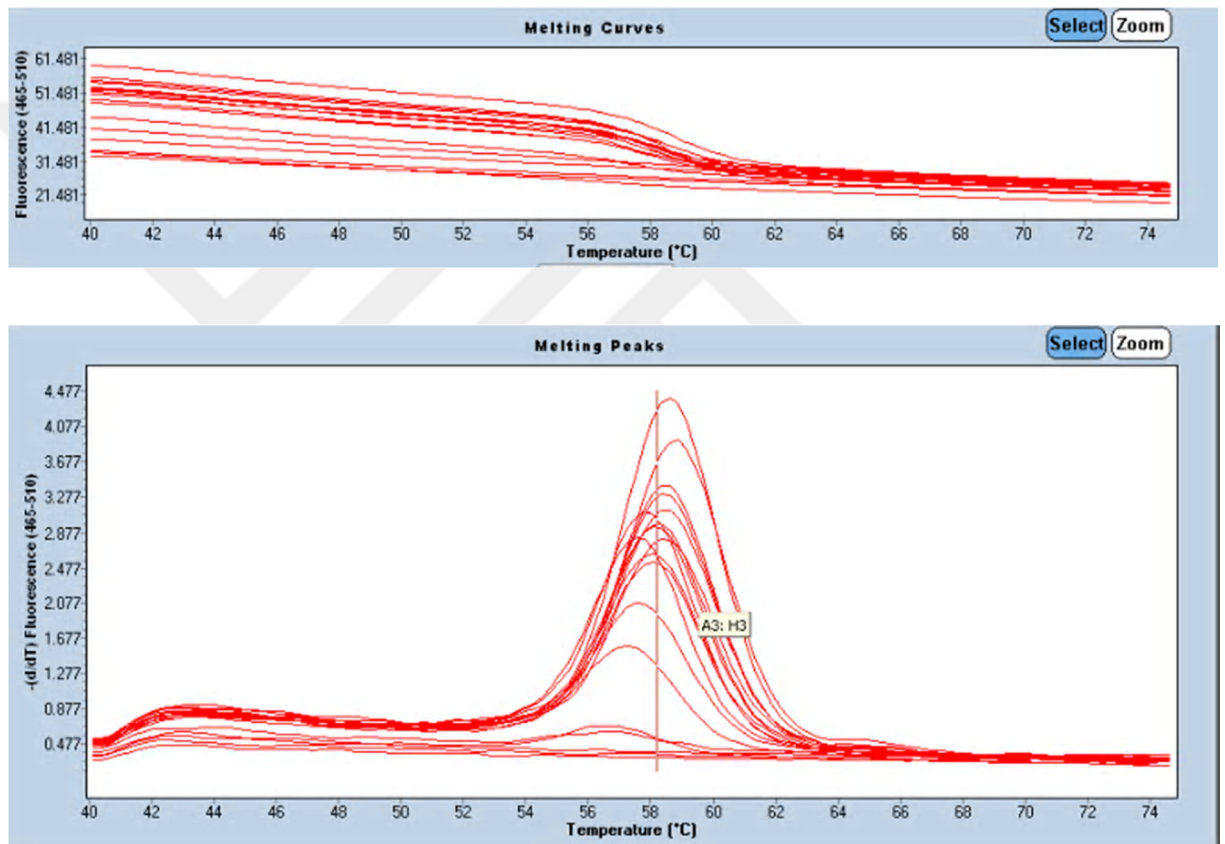
Kontrol grubunda CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre popülasyonu değerleri uygun kapılamalar yapılarak değerlendirildi. Örnek teşkil etmesi için kontrol grubundaki CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü (Şekil 4.4.1) 'de gösterildi.



Şekil 4.4.1. Kontrol grubundaki K1 nolu kontrolün akım sitometrik kapılama ile CD34⁺, CD31⁺, CD38⁺, CD116⁺, CD146⁺ hücre değerlerinden elde edilen akım sitometrik analiz görüntüsü

4.5. KDR gen polimorfizm taranması sonuçları

Real-Time PCR sisteminde FastStart DNA Master HybProbekullanılarak yapıldı. Gen polimorfizmi analizi için 11 ROP hasta grubu ve 8 sağlıklı prematüre bebek kullanıldı. 11 kişiden oluşan hasta grubunda KDR gen polimorfizmine rastlanacak nükleotid değişimi gözlenmedi. Bütün hasta grubu homozigot allellere sahipti (Tablo 4.5). KDR gen polimorfizmi için hasta ve kontrol grubundaki sıcaklık eğrileri ve sıcaklık pikleri verilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. KDR gen polimorfizminin hasta ve kontrol grubundaki sıcaklık ve pik eğrileri ile taranmasının gösterimi

4.5.1. Hasta ve Kontrol Grubunda KDR Gen Polimorfizmi Taranması Sonuçları

11 Hasta ve 8 kontrol örneğinin polimorfizmanalizinde homozigot normal allel yapısına rastlandı. Taraması yapılan p.cys482arg polimorfimine ilişkin heterozigot allel veya mutasyon gözlenmedi (Tablo 4.5.1).

Tablo 4.5.1. Hasta ve kontrollerdeki KDR gen p.cys482arg polimorfizm sonuçları

Çalışmadaki KDR gen polimorfizm durumu			
Hastalar	Allele /fenotip	Kontroller	Allel/fenotip
Hasta 1	AA(Homozigot)	Kontrol 1	AA (Homozigot)
Hasta 2	AA (Homozigot)	Kontrol 2	AA (Homozigot)
Hasta 3	AA (Homozigot)	Kontrol 3	AA (Homozigot)
Hasta 4	AA (Homozigot)	Kontrol 4	AA (Homozigot)
Hasta 5	AA (Homozigot)	Kontrol 5	AA (Homozigot)
Hasta 6	AA (Homozigot)	Kontrol 6	AA (Homozigot)
Hasta 7	AA (Homozigot)	Kontrol 7	AA (Homozigot)
Hasta 8	AA (Homozigot)	Kontrol 8	AA (Homozigot)
Hasta 9	AA (Homozigot)		
Hasta 10	AA (Homozigot)		
Hasta 11	AA(Homozigot)		

4.6. KDR Geninin Hasta ve Kontrollerde Ekspresyon Analizi Sonuçları

11 ROP hasta grubundan oluşan hastaların 7'sinde KDR gen ekspresyonu artışı gözlemlendi (Tablo 4.6). KDR gen ekspresyonunun hasta grubundaki medyan değeri 32 olarak bulundu (Tablo 4.6.2) (p : 0.246).

Tablo 4.6. Hasta grubunda KDR gen ekspresyonu sonuçları

Hasta Adı	Beta-Aktin CT Değerleri	<i>KDR</i> geni CT değerleri	Normalize status değerleri
Kalibratör	23.13	35.54	6×10^{-2}
H1	15.40	32.48	9.6×10^{-2}
H2	16.24	31.81	16.59×10^{-2}
H3	25.76	0	(eksprese olmamış)
H4	16.80	32.84	12.28×10^{-2}
H5	18.44	34.83	9.6×10^{-2}
H6	21.96	0	(eksprese olmamış)
H7	14.15	32.20	3.21×10^{-2}
H8	20.84	32.91	1.73×10^{-2}
H9	16.05	32.62	8.5×10^{-2}
H10	19.88	0	(eksprese olmamış)
H11	22.17	0	(eksprese olmamış)

8 sağlıklı yenidoğan bebekten oluşan kontrol grubunda 3 kişide KDR gen ekspresyonunda artış gözlemlendi (Tablo 4.6.1). KDR gen ekspresyonunun kontrol grubundaki medyan değeri 32.4 olarak bulundu (Tablo 4.6.2) (p : 0.246).

Tablo 4.6.1. Kontrol grubunda KDR gen ekspresyonu sonuçları

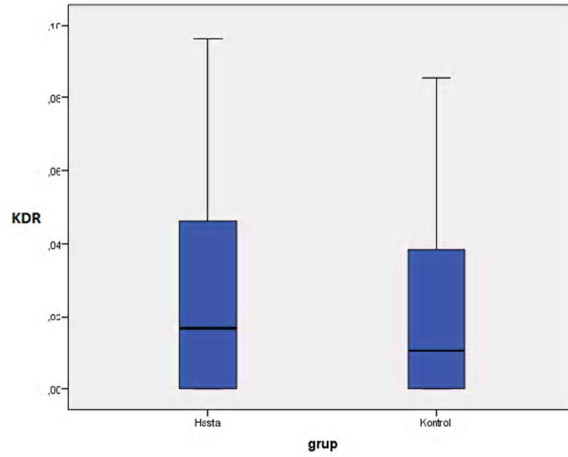
Kontrol Adı	Beta-Aktin CT Değerleri	KDR geni CT değerleri	Normalize status değerleri
K1	23.81	0	(eksprese olmamış)
K2	15.93	32.49	8.56×10^{-2}
K3	23.13	35.54	1×10^{-2}
K4	30.36	0	(eksprese olmamış)
K5	16.26	32.52	10.61×10^{-2}
K6	18.88	0	(eksprese olmamış)
K7	21.53	35.04	6.5×10^{-2}
K8	26.55	0	(eksprese olmamış)

Hasta ve kontrollerde karşılaştırılan KDR gen ekspresyonunun gruplara göre medyan değerleri verilmiştir (Tablo 4.6.2). KDR geni mRNA ekspresyonunun hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırması gösterilmiştir (Şekil 4.6).

Tablo 4.6.2. Hasta ve kontrollerde KDR gen ekspresyonu sonuçlarının karşılaştırması

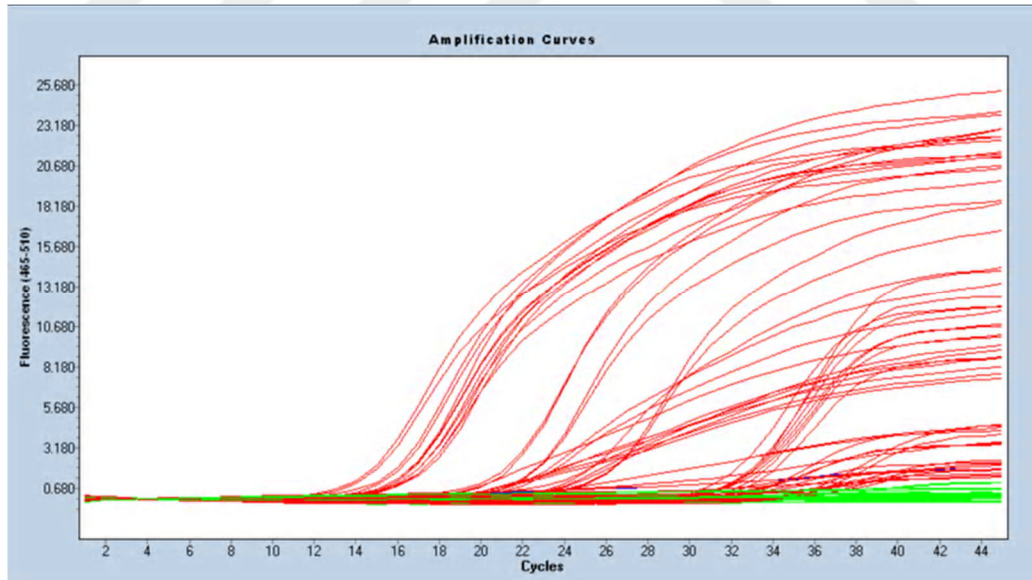
KDR	Gruplara göre medyan değerleri		<i>p</i>
	Hasta (n=11)	Kontrol (n= 8)	0.724
	32.0 (0.0±32.6)	32.4 (0.035±0.724)	0.246

Veriler ortanca değer olarak gösterilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



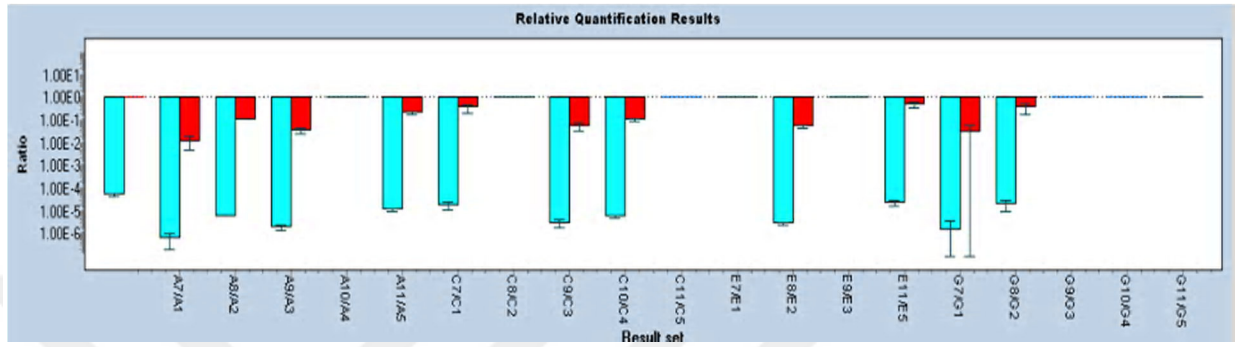
Şekil 4.6. KDR geni mRNA ekspresyonunun hasta ve kontrol grubunda medyan değerlerinin istatistiksel olarak karşılaştırması (p : 0.724)

ROP hasta grubu ve ROP olmayan sağlıklı kontrol grubundaki KDR gen ekspresyonunun amplifikasyon eğrileri verilmiştir (Şekil 4.6.1).



Şekil 4.6.1. KDR gen ekspresyonunun hasta ve kontrol grubundaki amplifikasyon eğrileri

ROP hasta grubu ve ROP olmayan sağlıklı kontrol grubundaki KDR gen ekspresyonunun karşılaştırmalı artış sonuç grafiği verilmiştir (Şekil 4.6.2). Yeşil renkli olan sütun hasta grubunu teşkil ederken kırmızı renkli sütun kontrol grubunu teşkil etmektedir.



Şekil 4.6.2. Hasta ve kontrollerdeki KDR gen ekspresyonunun karşılaştırmalı artış sonuç grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Prematüre retinopatisi (ROP), hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde çocukluktan kaynaklanan körlüğün önlenilecek en önemli nedenlerinden biridir. Esasen retinada neovasküler bir hastalık olan ROP, neredeyse sadece erken doğum ağırlıklı bebeklerde görülür. Erken doğum ağırlıklı bebeklerin hayatta kalma süresinin artmasıyla birlikte, ROP'a bağlı görme bozukluğu olan çocukların mutlak sayısı son yıllarda artmıştır(156). Ayrıca prematüre retinopatisinde %70 oranında genetik yatkınlık olduğu düşünülmektedir (44).

Gilbert ve arkadaşları gelişmiş ülkelerde ağır ROP gelişen bebeklerin sayısının, az gelişmiş ülkelerde etkilenen bebeklerden daha az olduğunu bildirmiştir (157). Carmeliet ve arkadaşları, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) nün, sağlık ve hastalıkta kan damarı oluşumunun başlıca düzenleyicisi olduğunu belirtmiştir (87,88,89). Leung ve arkadaşları, VEGF reseptör sinyal iletişiminin vucutta bulunan hücre göçü, proliferasyon ve hayatta kalma gibi diğer hücrel sisyal iletişim sistemlerinin bir benzeri olduğunu bildirmiştir (158).

VEGF'nin dikkatlice titre edilmiş seviyeleri kan damarı gelişimi için çok önemlidir, çünkü VEGF'nin heterozigot delesyonunun farelerde öldürücü olduğu bildirilmiştir. Geçtiğimiz yıllarda, VEGF sinyallesinin, endotel hücre davranışını sıkı bir şekilde kontrol ettiği anlaşılmıştır. Ayrıca farklı VEGF izoformları ve VEGF reseptörleri ile çok karmaşık bir iletim ağı olduğu ortaya çıkmıştır. İlginç olarak, VEGF reseptörü 2 (kinaz insert domain reseptörü [KDR], ana proanjiojenik VEGF reseptörlerinden biri olmasına rağmen, VEGF'nin VEGF reseptörüne 1 (fms-ilişkili tirozin kinaz 1 (FLT1)3 bağlanması, proanjiojenik sinyallemeyle sonuçlanmaz. Bu, FLT1'in VEGF için bir tuzak veya tuzak olarak davrandığı kavramını ortaya çıkarmıştır. FLT1'in VEGF sinyalizasyonunu negatif olarak düzenleyebileceği ve bu durumun, kornea gibi organlarıavasküler tutmak için, ancak aynı zamanda proanjiojenik ve antianjiojenik faktörler arasındaki ince dengeyi kontrol etmede yardımcı olduğunu bulmuşlardır (159).

Çalışmamızda ilk olarak akım siometrik analiz çalışmaları ile ROP ile ilişkili olabileceği düşünülen hücre yüzey reseptörlerinin akım sitometri ile ekspresyon düzeyi ölçüldü. Bu amaçla GM-CSF reseptörüne özgün CD116'yı yüksek düzeyde eksprese eden hücreler belirlendi. Akım sitometrik analiz sonucunda immatür monositlerin göstergesi olan CD116⁺ eksprese eden hücre sayısının hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu bulundu (medyan H: 56,0, medyan K: 49,5)(*p*: 0,860). Kontrol grubu ile karşılaştırmasında değerler yüksek olmasına rağmen örnek sayısının azlığı nedeniyle anlamlılık elde edilemedi. Hastalarda endotel hücre öncüsü olarak bilinen immatür monositlerin kısmi artış endotel hücre gelişimi ile ilişkili olabileceği ve ROP hastalarında vasküler ağ oluşumunda bozulmalar nedeni ile de etkilenmiş olabileceği düşünüldü. Bir parametre olarak CD116'nın daha geniş kapsamlı hasta gruplarında araştırılması, ROP hastalarındaki patofizyolojinin anlaşılmasında ve vasküler yapılanmanın bozulmasındaki etkenlerin daha iyi tanınarak tedaviye katkılarının belirlenmesinde yardımcı olabilir.

Hücre adezyon molekülü CD146, ilk olarak, malignant melanositler üzerindeki ekspresyonu nedeniyle 1987'de tarif edilmiş ve melanoma hastalarının negatif prognozu ile ilişkilendirilmiştir. CD146 immünoglobulin süper ailesinin hücre adhezyon moleküllerinin (CAM) bir üyesi olarak tanımlanabilir. Ayrıca CD146, endotelial hücrelerin bir hücre yüzeyi antijeni olarak tanımlandı. CD146, kardiyovasküler hastalıklar, iltihaplanma veya kanser gibi patolojik durumlarda artmış olan dolaşımdaki endotelial hücrelerin (CEC) işaretleyicisi olarak popüler hale gelmiştir. Jiang ve arkadaşları, coimmunoprecipitation deneylerinde CD146 ve VEGFR2 arasındaki doğrudan bağlanmayı göstermektedir. Bu etkileşimin, hücre dışı bir CD146 epitopunun, VEGFR2 ve CD146 arasındaki etkileşimi bloke edebildiğini kabul eden ekstrasellüler protein alanında gerçekleştiğini bulmuşlardır (160).

Akım sitometrik analiz sonucunda endotel kök hücre markırı olan CD146⁺ hücre sayısı ROP hastalarında kontrol grubuna göre daha fazla bulundu (medyan H: 88,0, medyan K: 85,0)(*p*: 0,791). Elde edilen veriler damarsal yapıların oluşumunda rol alan immatür monositik hücrelerin ROP oluşumundaki rolü konusunda açıklayıcı olabilir. Özellikle ROP hastalarının akım sitometri ile tanısında kullanılacak yeni parametrelere iyi bir kaynak olabileceği düşünüldü. Bu yüzey markırlarının bir parametre olarak daha geniş

kapsamlı araştırma izlenmesi ROP hastalarının tanısında ve izlenmesinde yeni markırlar bulmamızı sağlayabilir.

Bu çalışmada ayrıca ROP hastalarında sıklıkla rastlanan KDR gen polimorfizmi kontrol edildi. KDR gen polimorfizmi taraması yapılan 11 hastanın tamamında KDR geninde en sık görülen p.cys482arg polimorfizmine rastlanmadı (Şekil 4.5). Hastaların tamamında homozigot normal allele rastlandı ve heterzigot mutant allel gözlenmedi (Tablo 4.5.).

Çalışmada ayrıca vascularizasyonda etkin rolü olduğu bilinen KDR geninin ekspresyonu ölçüldü. ROP hasta grubunda 11 hastadan 7'sinde KDR gen ekspresyonunun artmış olduğu gözlendi (Tablo 4.6). Kontrol grubunda ise 8 kişiden 3'ünde KDR gen ekspresyonu artışı gözlendi (Tablo 4.6.1). Bu veriler hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla KDR eksprese edildiğini gösterdi (Tablo 4.6.2) (p : 0,820). Kontrol grubunda yer alan 3 premature bebekte izlenen KDR ekspresyon artışının da ROP tanısız çalışmalarının yeniden kontrolü yönünden anlamlı olabileceği, klinik bulgu vermeyen ROP vakaları yönünden izlemede yardımcı olabilir. Bu amaçla daha fazla hasta örneği ile yapılacak ekspresyon çalışmalarının yol gösterici olabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak bir endotel kök hücre göstergesi olan KDR gen ekspresyonunun premature bebeklerde rutin analizi ROP hastalarının daha kolay fark edilmesine ve erken tanı ve tedavi fırsatlarına erişerek görme kaybı oluşumunu önlemeye katkı sağlayabilir. Bu parametreler akım sitometrik immatür monosit markırları ile desteklenirse daha ayırıcı tanısız sonuçların eldesi mümkün olabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Gilbert C. Retinopathy of prematurity. In: A global perspective of the epidemics, population of babies at risk and implications for control. *Early Hum Dev* 2008; pp 84 :77-82.
2. Ryan SJ. 2013. *Retina*, Oxford: Saunders Elsevier. BMA Medical Book Awards Highly Commended in Surgical Specialties; pp 2564: 2340-2345.
3. Sood BG, Madan A, Saha S, et al. Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 2010; 67: 394-400.
4. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007; 10 (2) :133-140.
5. Thébaud B, Lacaze-Masmonteil T, Watterberg K. Postnatal glucocorticoids in very preterm infants. *Pediatrics* 2001;107(2): 413-415.
6. Patz A. Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980; 19:1133-1138.
7. Terry T. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. Preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1942; 25: 203-204.
8. Kinsey V.E. Hemphill FM. Etiology of retrolental fibroplasia and preliminary report of cooperative study of retrolental fibroplasia. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngo* 1955; 59:15-24
9. Yaman A, Çetin E, Berk A.T ve ark. Prematür Retinopatisinde Tedavi Sonuçlarımız. *Ret – Vit* 2004; 12: 122-125.
10. Özkan H, Köksal N, Steinmetz RL. Prematüre Retinopatisi. *Güncel Pediatri* 2005; 2: 24-28
11. Arsan S. Prematüre Retinopatisi. *T Klin Pediatri* 2004; 2: 382-386.
12. Brooks HL Jr. Diode laser photocoagulation to the ridge and avascular retina in threshold retinopathy of prematurity. *Retina* 2002; 22: 48-52.

13. Palmer, Phelps D, Phelps, D.L., Spencer, R. Retinopathy of Prematurity. Ed: Ryan SJ, Retina 2006; 80: 1447-1474.
14. Gilbert C. Retinopathy of prematurity- the “second lull”. Br J Ophthalmol 2001; 85: 1017-1019.
15. Sarıcı S Ümit, Mutlu F Mehmet, Altınsoy H İbrahim. Prematüre Retinopatisi, Çocuk sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2008; 51: 51-56.
16. C. Corina Gerontis. Retinopathy of Prematurity. e-Medicine 2002; 1:15.
17. Crofts B.J, King R, Jhonson A. The contribution of low birth weight to severe vision loss in a geographically defined population. British Journal of Ophthalmology 1998; 82: 9-13.
18. Quinn G.E. What do you do about ROP screening in big babies. Br J Ophthalmolog. 2002; 86: 1072-1074.
19. Kinsey, V.E., Arnold, H.J., Kalina, R.E., et al. PaO₂ levels and retrolental fibroplasia: a report of the cooperative study. Pediatrics 1977; 60:655-668.
20. York JR, Landers S, Kirby RS, et al. Arterial oxygen fluctuation and retinopathy of prematurity in very-low-birth-weight infants. J Perinatol 2004; 24:82–87.
21. Hellstrom A, Hard AL, Engstrom E, et al. Early weight gain predicts retinopathy in preterm infants: new, simple, efficient approach to screening. Pediatrics 2009; 4:123.
22. Penn JS. Oxygen-induced retinopathy in the rat: possible contribution of peroxidation reactions. Doc Ophthalmol 1990; 74:179–86.
23. Mintz-Hittner HA, Kuffel RR Jr. Intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for treatment of stage 3 retinopathy of prematurity in zone I or posterior zone II. Retina 2008; 28:831-838.
24. Kopylov U, Sirota, L., Linder, N. Retinopathy of prematurity risk factors Harefuah 2002; 141:1066-1069.
25. Sato T., Kusaka, S., Hashida N., et al. Comprehensive geneexpression profile in murine oxygen-induced retinopathy. Br J Ophthalmol 2009; 93:96-103.
26. The natural ocular outcome of premature birth and retinopathy. Status at 1 year. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. 1994. Arch Ophthalmol. 1994; 112:903-912.
27. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative

- Group. *Ophthalmology* 1991; 98:1628-1640.
28. Good WV, Hardy RJ, Dobson V, et al. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Pediatrics* 2005; 116:15-23.
 29. Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor antagonist therapy for retinopathy of prematurity. *Clin Perinatol* 2014; 41:925-943.
 30. Goog WV, Hardy RJ, Dobson V, et al. The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Pediatrics* 2005; 116: 15-23.
 31. Committee for Classification of ROP. The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. An international classification of retinopathy of prematurity. *Archives of Ophthalmology* 1984; 102(8):1130-1134.
 32. Larsson E, Carle-Petrelus B, Cernerud G, et al. Incidence of ROP in two consecutive Swedish population based studies. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1122-1126
 33. Bas AY, Koc E, Dilmen U, ROP Neonatal Study Group. Incidence and severity of retinopathy of prematurity in Turkey. *Br J Ophthalmol* 2015; 99(10): 1311-1314.
 34. Löfqvist C, Andersson E, Sigurdsson J, et al. Longitudinal postnatal weight and insulin-like growth factor I measurements in the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2006; 124:1711-1718.
 35. Gupta VP, Dhaliwal U, Sharma R, Gupta P, Rohatgi J. Retinopathy of prematurity risk factors. *Indian J Pediatr* 2004; 71(10):887-892.
 36. Akkoyun I, Oto S, Yilmaz G, et al. Risk Factors in the Development of Mild and Severe Retinopathy of Prematurity. *J Am Assoc Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2006; 10(5):449-453.
 37. McColm JR, Geisen P, Hartnett ME. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: relevance to clinical ROP. *Mol Vis* 2004; 10:512-520.

38. Chow LC, Wright KW, Sola A, CSMC Oxygen Administration Study Group. Can changes in clinical practice decrease the incidence of severe retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003; 111(2):339-345.
39. Fleck BW, McIntosh N. Pathogenesis of retinopathy of prematurity and possible preventive strategies. *Early Hum Dev* 2008; 84(2): 83-88.
40. Schmidt B, Davis P, Moddemann D et al. Trial of Indomethacin Prophylaxis in Preterms Investigators. Long-term effects of indomethacin prophylaxis in extremely-low-birth-weight infants. *N Engl J Med* 2001; 28;344(26):1966-1972.
41. Sharma J, Barr SM, Geng Y et al. Ibuprofen improves oxygen-induced retinopathy in a mouse model. *Curr Eye Res* 2003; 27(5): 309-314.
42. Cooke WI, Drury JA, Mountford R et al. Genetic polymorphism and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1712-1715.
43. Tadesse M, Dhanireddy R, Mittal M et al. Candida sepsis, and retinopathy of prematurity. *Biol Neonate* 2002; 81(2): 86-90.
44. Bizzarro MJ, Hussain N, Jonsson B, et al. Genetic Susceptibility to Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics* 2006; 118(5):1858-1863.
45. Phan MH, Nguyen PN, Reynolds JD. Incidence and severity of retinopathy of prematurity in Vietnam, a developing middle-income country. *J Pediatrics Ophthalmol Strabismus* 2003; 40: 208-212.
46. Haroon Parupia MF, Dhanireddy R. Association of postnatal dexamethasone use and fungal sepsis in the development of severe retinopathy of prematurity and progression to laser therapy in extremely low-birth-weight infants. *J Perinatol* 2001; 21(4): 242-247.
47. Ng YK, Fielder AR, Shaw DE, Levene MI. Epidemiology of retinopathy of prematurity. *Lancet (London, England)*. 1988; 2(8622):1235-1238.
48. Csak K, Szabo V, Szabo A, Vannay A. Pathogenesis and genetic basis for retinopathy of prematurity. *Front Biosci* 2006; 11:908-920.
49. Finer NN, Schindler RF, Grant G, Hill GB, Peters K. Effect of intramuscular vitamin E on frequency and severity of retrolental fibroplasia. A controlled trial. *Lancet, London, England* 1982; 1(8281):1087-1091.
50. Hammer ME, Mullen PW, Ferguson JG, et al. Logistic analysis of risk factors in acute retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 1986; 102(1):1-6.

51. Shah VA, Yeo CL, Ling YLF, Ho LY. Incidence, risk factors of retinopathy of prematurity among very low birth weight infants in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 2005; 34(2):169-178.
52. Velez-Montoya R, Clapp C, Rivera JC, et al. Intraocular and systemic levels of vascular endothelial growth factor in advanced cases of retinopathy of prematurity. *Clin Ophthalmol* 2010; 4:947-953.
53. Ashton N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. *Am J Ophthalmol* 1966; 62:412-435.
54. Flynn JT. Retinopathy of prematurity. *Pediatr Clin North Am* 1987; 34:1487-1515.
55. Foos RY, Kopelow SM. Development of retinal vasculature in paranatal infants. *Surv Ophthalmol* 1973; 18:117-127.
56. Fielder AR, Moseley MJ, Ng YK. The immature visual system and premature birth. *Br Med Bull* 1988; 44:1093-1118.
57. Roth, AM. Retinal vascular development in premature infants. *Am J Ophthalmol* 1977; 84:636-640.
58. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 2007; 10(2): 77-88
59. Provis JM. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20(6):799-821.
60. Gilbert C, Fielder A, Gordillo L, et al. Characteristics of infants with severe retinopathy of prematurity in countries with low, moderate, and high levels of development: implications for screening programs. *Pediatrics* 2005; 115:518-525.
61. Smith LE, Wsolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the Mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35: 101-111.
62. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *British Journal of Ophthalmology* 1954; 38(7):397-432.
63. Pierce EA, Foley ED, Smith LE. Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Archives of ophthalmology* 1996; 114(10): 1219-1228.

64. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: preliminary results. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:471- 479.
65. Phan MH, Nguyen PN, Reynolds JD. Incidence and severity of retinopathy of prematurity in Vietnam, a developing middle-income country. *J Pediatrics Ophthalmol Strabismus* 2003; 40: 208-212.
66. Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D. Assignment of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Placenta Growth Factor (PlGF) Genes to Human Chromosome 6p12 and 14q24-q31 Regions, Respectively *Genomics* 1996; 32:168-169.
67. Ferrara, N. Role of VEGF in Regulation of Physiological Angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:1358-1366.
68. Thomas KA. Vascular Endothelial Growth Factor, A Potent and Selective Angiogenic Agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-606.
69. Shalaby R, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu X, Breitman ML. Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis In Flk-1 Deficient Mice. *Nature* 1995; 376-462.
70. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene To Human Chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; 93:1493-95.
71. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-936.
72. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med* 1999; 5: 434-438.
73. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. 2005; 105:1068-1077.
74. Fearnley GW, Odell AF, Latham AM, et al. VEGF-A isoforms differentially regulate ATF-2-dependent VCAM-1 gene expression and endothelial-leukocyte interactions. *Mol Biol Cell* 2014; 25: 2509-2521.

75. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
76. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya MA. Novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF). *J Biol Chem* 1998; 273: 31273-31282.
77. Yamazaki Y, Matsunaga Y, Tokunaga Y, et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. *J Biol Chem* 2009; 284: 9885-9891.
78. Iyer S, Acharya KR. Tying the knot: The cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines *FEBS J.* 2011; 278: 4304-4322.
79. Muller YA, Heiring C, Misselwitz R, Welfle K, Welfle H. The cystine knot promotes folding and not thermodynamic stability in vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 2002; 277: 43410-43416.
80. Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189-31195.
81. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 152: 1445-1545.
82. Brogi E, Wu T, Namiki A. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; 90: 649-652.
83. Banks RE, Forbes M, Kinsey SE, Stanley A, et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: Significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1998; 77: 956-964.
84. Gaudry M, Brégerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo M-AA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997; 90: 4153-4161.
85. Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K. Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* 2011; 118: 2906-2917.

86. Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, et al. The Concise Guide to pharmacology Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 5979-6023.
87. Shibuya M. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harb. Perspect Biol* 2013; 5: 1-13.
88. Smith GA, Fearnley GW, Tomlinson DC, Harrison MA, Ponnambalam S. The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biosci Rep* 2015; 35: 100-253.
89. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 611-625.
90. Meyer RD, Mohammadi M, Rahimi N. A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *J Biol Chem* 2006; 281: 867-875.
91. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22
92. Liu Y. Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells. *Circ Res* 1995; 77: 638-643.
93. Forsythe JOA, Jiang B, Iyer NV, Agani F, Leung SW. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-4612.
94. Mineur P, Colige AC, Deroann CF, et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol* 2007; 179: 1261-1273.
95. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, et al. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci* 2008; 121: 3487-3495.
96. Venables J.P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *BioEssays* 2006; 28: 378-386.
97. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The Human Gene for Vascular Endothelial Growth-Factor. Multiple Protein Forms Are Encoded Through Alternative Exon Splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.

98. Guyot M, Pages G. VEGF Splicing and the Role of VEGF Splice Variants: From Physiological-Pathological Conditions to Specific Pre-mRNA Splicing. In *Methods in Molecular Biology*; Springer. Berlin, Germany 2015; pp: 3-24.
99. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C. Different Signal-Transduction Properties of Kdr and Flt1, 2 Receptors for Vascular Endothelial Growth-Factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-26995.
100. Eswarappa SM, Potdar AA, Koch WJ, et al. Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell*. 2014; 157: 1605-1618.
101. Yona S, Kim KW, Wolf Y, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 2013; 38: 79-91.
102. Serbina NV, EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol Pamer* 2006; 7: 311-317.
103. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009; 113: 963–972.
104. Jung H, Mithal DS, Park JE, Miller RJ. Localized CCR2 Activation in the Bone Marrow Niche Mobilizes Monocytes by Desensitizing CXCR4. *PLoS One* 2015; 10: 1-13.
105. Ginhoux F, Jung S. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 392-404.
106. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 2010; 33: 375-386.
107. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010; 115 :10-19.
108. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011; 118: 16-31.
109. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol* 2008; 26: 421- 452.

110. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol* 2011; 11: 762-774.
111. Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation* 2010; 121: 2437-2445.
112. Leuschner F, Dutta P, Gorbato R, et al. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 1005-1010
113. Majmudar MD, Keliher EJ, Heidt E, et al. Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 2013; 127: 2038-2046.
114. Poupel L, Boissonnas A, Hermand P, et al. Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 2297-2305.
115. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol* 2010. 11, 585-593.
116. Manni S, Kisko K, Schleier T, Missimer J, Ballmer-Hofer K. Functional and structural characterization of the kinase insert and the carboxy terminal domain in VEGF receptor 2 activation. *FASEB J* 2014; 28: 4914-4923.
117. McMullen ME, Bryant PW, Glembotski CC, Vincent PA, Pumiglia KM. Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 20995-21003.
118. Chen, XL, Nam JO, Jean C, et al. VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK. *Dev Cell* 2012; 22: 146-157.
119. Lanahan AA, Lech D, Dubrac A, et al. PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation* 2014; 130: 902-909.
120. McTigue MA, Wickersham JA, Pinko C, et al. Crystal structure of the kinase domain of human vascular endothelial growth factor receptor 2: A key enzyme in angiogenesis. *Structure* 1999; 7: 319-330.

121. Pang V, Bates DO, Leach L. Regulation of human feto-placental endothelial barrier integrity by vascular endothelial growth factors: Competitive interplay between VEGF-A165a, VEGF-A165b, PlGF and VE-cadherin. *Clin Sci* 2017; 131: 2763-2775.
122. Pan Q, Chathery Y, Wu Y, et al. Tessier-Lavigne M, Koch AW, Watts RJ. Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 2007; 282: 24049-24056.
123. Shiyong W, Boyun S, Jianye Y, et al. The Different Effects of VEGFA121 and VEGFA165 on Regulating Angiogenesis Depend on Phosphorylation Sites of VEGFR2. *Inflamm Bowel Dis* 2017; 23: 603-616.
124. Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW. Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 17615-17622.
125. Gourlaouen M, Welti JC, Vasudev NS, Reynolds AR. Essential Role for Endocytosis in the Growth Factor-stimulated Activation of ERK1/2 in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2013; 288: 7467-7480.
126. Jopling HM, Odell AF, Pellet-Many C, et al. Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation. *Cells* 2014; 3: 363-385.
127. Ewan LC, Jopling HM, Jia H, et al. Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic* 2006; 7: 1270-1282.
128. Basagiannis D, Christoforidis S. Constitutive endocytosis of VEGFR2 protects the receptor against shedding. *J Biol Chem* 2016; 291: 16892-16903.
129. Bruns AF, Herbert SP, Odell AF, et al. Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by co-ordinated trafficking and proteolysis. *Traffic* 2010; 11: 161-174.
130. Clegg LW, Mac Gabhann F. Site-Specific Phosphorylation of VEGFR2 Is Mediated by Receptor Trafficking: Insights from a Computational Model. *PLOS Comput Biol* 2015; 11(6): 1-36.
131. Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: Isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25: 1-19.

132. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. The Vascular Endothelial Growth Factor Proteins: Identification of Biologically Relevant Regions by Neutralizing Monoclonal Antibodies. *Growth Factors* 1992; 7: 53-64.
133. Rah H, Jeon YJ, Lee BE, et al. Association of kinase insert domain-containing receptor (KDR) gene polymorphisms with idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women, *Fertil Steril* 2013; 99(3): 753-760.
134. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, et al. Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(8): 760-767.
135. Csak K, Szabo V, Szabo A, Vannay A. Pathogenesis and genetic basis for retinopathy of prematurity. *Front Biosci* 2006; 11: 908-920.
136. Hartnett ME. Vascular endothelial growth factor antagonist therapy for retinopathy of prematurity. *Clin Perinatol* 2014; 41: 925-943.
137. Sato T, Wada K, Arahori H, et al. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2012; 153: 321-333.
138. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 563-604.
139. Fogg DK, Sibon C, Miled C, et al. clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006; 311: 83-87.
140. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009; 324: 392-397.
141. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118.
142. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH. Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 2007; 179: 7577-7584.

143. Varol C, Landsman L, Fogg DK, et al. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2007; 204: 171-180.
144. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 2006; 7: 311-317.
145. Cros J, Cagnard N, Woollard K, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*. 2010; 33: 375-386.
146. Kawamura S, Identification of a Human Clonogenic Progenitor with Strict Monocyte Differentiation Potential: A Counterpart of Mouse cMoPs. *Immunity* 2017; 46: 835–848.
147. Gaëlle Breton, Jaeyop Lee, Kang Liu, Michel C, Nussenzweig. Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nat Protoc* 2015; 10(9): 1407-1422.
148. Dunphy CH. Applications of Flow Cytometry and immunohistochemistry to Diagnostic Hematopathology. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128(9): 1004-1022.
149. Laane E, Tani E, Björklund E, et al. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry Part B Clinical Cytometry* 64B1 2005; pp: 34-42.
150. İsmail K, Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 2008; 2: 1-18.
151. WEB_1.(2017). Beckman coulter life sciences web site. <https://www.beckman.com/resources/reading-material/catalogs/flow-cytometry-catalog> (21.07.2018)
152. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193.
153. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95-125.

154. Mannsmann U, Herzig M. The use of SNP profiles as clinical markers. IMBI, University of Heidelberg. <http://www.biometrie.uni-heidelberg.de/mitarbeiter/MannsmannUlrich>
155. Ye SQ, Lavoie T, Cusher D, Zhang LQ. Microarray, SAGE and their applications to cardiovascular disease. *Cell Research* 2002; 12: 105-115.
156. Gilbert C, Muhit M. Twenty years of childhood blindness: what have we learnt. *Community Eye Health / International Centre for Eye Health* 2008; 21(67): 46–47
157. Clare G, Alistair F, Luz G, et al. Retinopathy of prematurity, screening, development index 2004; 10: 1180-1542.
158. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
159. Jasmin W, Walter F. CD146: a new partner for VEGFR2. 2012; 120: 2164-2165.
160. Reinier AB. MicroRNAs Control Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. 2012; 111: 1388-1390.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEB/80)							
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU							
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Prematüre retinopatisinde intravitreal anti-VEGF tedavilerinin kan endotelial progenitor hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi					
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU							
DEĞERLENİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama					
	SIGORTA						
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ						
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU						
	ILAN						
	YILLIK BİLDİRİM						
	SONUÇ RAPORU						
	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ						
DİĞER							
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2016/322	Tarih : 27.05.2016					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırma/çalışmaya girdiği, amaç, kapsam ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırma/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ilişkin olarak Etik Kurul üye tarfından zati çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye Sağlık ve Tıbbi Hizmet Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						
KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Sağ ve Biyoteknik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İy Klinik Uygulanması Kılavuzu					
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL					
Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma ile İlişki		Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Salih KUK	Tıbbi Parazitoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Kemal DEMİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof. Dr. Musa KARAKUKÇU	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Aydin UNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Güven KAHRIMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim-Hesl	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağır. Dis. ve Cene Radyolojisi	E.Ü. Dis. Hek. Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>		
Doç. Dr. Changir BIÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Yard. Doç. Dr. Zafar SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Serkan KARACA	Sivil Üye	Öğretmen	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
* Tıbbi Bilim Uzmanı							
Etik Kurul Başkanı Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL İmza:							

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAEK-80)

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Prematüre retinopatisinde intravitreal anti-VEGF tedavilerinin kan endotelial progenitor hücreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKÖL KODU				
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı/Melikgazi/KAYSERİ		
	TELEFON	0 352 437 49 10 - 11		
	FAKS	0 352 437 52 95		
	E-POSTA	byancar@erciyes.edu.tr		
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Yardımcı Doç. Dr. Çağatay Karaca		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Göz Hastalıkları		
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı /Kaysen		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TUBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alıyorsa için)	Yardımcı Doç. Dr. Çağatay Karaca		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
FAZ 4		<input type="checkbox"/>		
Gozlemsel ilaç çalışması		<input checked="" type="checkbox"/>		
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>		
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>		
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>		
Diğer ise belirtiniz	Bireysel Araştırma Projesi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	
			ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
 Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
 İmza:

(Handwritten signature)

ASLI GİBİDİR
 T.C.
 ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
 Bahri YANCI
 Fakülte Şefi

PREMATURE RETİNOPATİSİ OLAN HASTALARDA KDR GEN POLİMORFİZM TARAMASI VE BAZI HÜCRE YÜZEY RESEPTÖRLERİN EKSPRESYON DÜZEYİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 9	% 9	% 2	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	cs hd.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
4	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
5	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	journals.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
7	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.of talmoloji.org İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı- Soyadı : Sevil- ÖZSOY

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 07.09.1991/ Pınarbaşı

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 507 9397339

e-mail : buse.sevilozsy@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
LİSE	Hakkı Altop Anadolu Lisesi, Kayseri	2010

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görev
2015-2016	Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji- Onkoloji Hastanesi Akım Sitometri ve Hücre İşleme Laboratuvarı	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

TEZLE İLGİLİ ULUSLARARASI KONGREDE KABUL EDİLEN POSTER

ECI2018 “5th European Congress of Immunology 02th-05th September 2018, Amsterdam”

Abstracts of the 5th European Congress of Immunology - ECI 2018 - Amsterdam, The Netherlands

POSTER PRESENTATIONS

PA1.02.21

Long-term effects of microglial depletion on tau pathology and spatial memory

H. Lund^{1,2}, K. Zhu^{1,2}, M. Fieber^{1,2}, M. Ohshima¹, K. Blomgren¹, X. Zhang^{1,2}, R. A. Harris^{1,2}

¹Department of Clinical Neuroscience, Applied Immunology and Immunotherapy, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, ²Center for Molecular Medicine, Karolinska Hospital at Solna, Stockholm, Sweden, ³Department of Women's and Children's Health, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

A hallmark of Alzheimer's disease pathology is neurofibrillary tangles comprising hyper-phosphorylated tau. Microglia are resident myeloid cells of the CNS that are implicated in neuro-inflammatory and neurodegenerative disorders. To investigate the reciprocal relationship between microglia and tau pathology we first characterized the microglial response in a mouse model of progressive tau accumulation (hTau mice). We did not detect changes in microglia surface receptor expression, proliferation, cytokine production, morphology or transcriptional profile in aged hTau mice indicating a lack of pathogenic microglia responses to tau aggregation. To assess the direct impact of microglia on tau pathology and associated neurological deficits we developed a protocol for long term microglial depletion in CX3CR1^{Cre/2fl} mice and crossed them with hTau mice. We then depleted microglia for 3 months which resulted in exacerbation of spatial memory function. These results indicate that microglia have a neuroprotective role during Alzheimer's related tau pathology.

PA1.02.22

Newborn babies have high number of immature monocytes expressed CD116 in peripheral blood than adults

M. Y. ~~Yılmaz~~ S. Örsay, B. Bingöl, S. Kınık, Ç. Karoçcu
Erciyes medical school, Kayseri, Turkey.

Monocytes are able to differentiate to dendritic cells (DCs) under inflammatory situations. Different monocyte subsets show distinct inflammatory cytokine profiles and differentiation potential under steady-state and inflammatory situations. The major subset of monocytes consists of CD14-high CD16-negative (CD14⁺⁺CD16⁻). Committed dendritic cell originated from immature monocytes. In humans (pre-CDC) that develops from committed DC progenitors (hCDPs) in the BM. We have measured the number of immature monocytes (pre-CDC) with CD14⁺CD38⁺CD116⁺ expression by flow cytometry with acquisition of a million cells from peripheral blood in 10 newborn and 10 adults. To determine the physiological distribution of hpre-CDCs in humans, we examined peripheral blood, of newborn and adult for small numbers of pre-CDCs travel through the blood and replace CDCs in the peripheral organs, maintaining homeostasis of the highly dynamic cDC pool. Monocyte-derived circulating short-lived pre-CDCs are high in newborn (mean:57 cells/million cells) than adults (mean:7 cells/million cells). We assume that any organ includes epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, stromal cells, and hematopoietic cells are a source of GM-CSF secretion. Circulations of CD116⁺ short-lived pre-CDCs undergo maturation when going through the vascular environment with high GM-CSF secretion to microenvironment.