2021

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ekin EFE

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUK EMBRİYOSU KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİ KULLANILARAK ANJİYOGENEZ SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN C-TİPİ NATRİÜRETİK PEPTİD İLE OLASI İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ekin EFE

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TAVUK EMBRİYOSU KORYOALLANTOİK MEMBRAN MODELİ KULLANILARAK ANJİYOGENEZ SÜRECİNDE ROL OYNAYAN MOLEKÜLLERİN C-TİPİ NATRİÜRETİK PEPTİD İLE OLASI İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ekin EFE

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

Bu araştırma; Başkent Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından DA20/14 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tavuk Embriyosu Koryoallantoik Membran Modeli Kullanılarak Anjiyogenez Sürecinde Rol Oynayan Moleküllerin C-Tipi Natriüretik Peptid ile Olası İlişkisinin İncelenmesi

Ekin EFE

Yüksek Lisans Tezi

09.06.2021

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Prof. Dr. Sevil ÇAYLI
Prof. Dr. Attila DAĞDEVİREN

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Ankara, 2021

Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. 09.06.2021

Adı SOYADI
Ekin EFE

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

TEŞEKKÜR

İlk günden beri beni destekleyen, benim için sonsuz destek ve güven kaynağı olan, hiçbir zaman iltifatını ve takdirini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bu tez çalışması başta olmak üzere her türlü bilimsel konuda desteğini aldığım ve alacağım sevgili hocam Prof. Dr. Ahmet Çevik Tufan'a

Kariyerimde dönüm noktası olmasına vesile olan ve beni destekleyen bilgilerini daima paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Attila Dağdeviren'e

Tezimde elektron mikroskop çalışmalarında bana destek olan sevgili hocam Prof. Dr. Figen Kaymaz'a

Üzerimde emekleri olan Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı kıymetli Öğretim Üyeleri; Prof. Dr. Habibe Meltem Özgüner'e, Prof. Dr. Sevil Çaylı'ya, Dr. Öğr. Üyesi Hilal Nakkaş'a ve Dr. Öğr. Üyesi Bahar Kartal'a,

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Gülben Akçan başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında en başından beri desteklerini aldığım ve hep yanımda olan kıymetli Dr. Öğr. Görevlisi Fatma Helvacıoğlu'na, Dr. Öğr. Görevlisi Pınar Ayran Fidan'a ve Dr. Öğr. Görevlisi Ayşegül Süzer'e, deneysel çalışmalarımda çok yardımları olan ve beni hep destekleyen sevgili meslektaşım Ece Lakşe Çoşar'a ve yardımları için laboratuvar teknisyenimiz AyhanYüksek'e,

Benim için çok kıymetli olan yıllardır benimle birlikte yol arkadaşlığı yapan biricik dostlarım, Tuğçe Özen Ekici'ye, Nefise Erdinçmer'e, Özge Lalegül Ülker ve eşi Erdi Ülker'e, Burcu Özacit ve sevgili eşi İrfan Özacit'e, Zeynep Şaklar Şahin ve Güvenç Şahin'e, Elvan Hortaç İştar ve eşi Mete İştar'a,

Bana bir aile yuvası daha veren, tanıştığımız ilk günden beri kucaklarını açan, sevgilerini esirgemeyen, daima mutlulukla birbirimizin yanında olduğumuz sevgili Ferda Efe'ye, Osman Attila Efe'ye ve büyüğümüz Ada'ya,

Herşeyden önemlisi varlık sebebim olan, hayatta en değerli şeyin okumak olduğunu ve sorumluluk taşımak olduğunu öğreten, her zaman desteklerini aldığım, sevgili babam Ahmet Kadri Ergin'e ve annem Mevlüde Mihriban Ergin'e, hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgisini en derinden hissettiğim ve onsuz bir şey düşünmediğim en değerli varlığım olan sevgili ablam Deniz Çakmur'a ve eşi Ejder Çakmur'a,

İlerlediğim bu yolda en büyük destekçim, biricik eşim Oğuzhan Ekin Efe’ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **v**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Vasküler Sistem Histolojisi ve Gelişimi 4
2.2. Anjiyogenez 7
2.2.1. Anjiyogenezde Görevli Büyüme Faktörleri 10
2.2.2. Anjiyogenezin Moleküler Mekanizması 12
2.2.3. Anjiyogenez Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller 15
2.3. Tavuk Embriyosu Gelişim Evreleri 17
2.3.1. Tavuk Koryoallantoik Membran Gelişimi 18
2.3.2. Koryoallantoyik Membran ve Anjiyogenez Çalışmaları 22
2.4. Natriüretik Peptidler ve Reseptörleri 24
2.4.1. C-Tipi Natriüretik Peptid ve Vasküler Yapılar ile İlişkisi 27
2.4.2. İnsan CNP ve Tavuk CNP-3 Homolojisi 29
3. MATERYAL ve YÖNTEM **31**
3.1. Etik Kurul Onayı 31
3.2. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi 31
3.3. Tavuk Embriyosu CAM Doku Örneklerinin Toplanması 31
3.4. Işık Mikroskop İncelemesi İçin Kullanılan Çözeltilerin/Boyaların Hazırlanışı 32
3.4.1. %10 Formol Fiksatifi (Tamponlu) Hazırlanması 32
3.5. CAM Doku Örneklerinin Işık Mikroskop İle Değerlendirilmesi 32
3.6. Transmisyon Elektron Mikroskop İncelemesi İçin Kullanılan Çözeltilerin/Boyaların Hazırlanışı 33
3.6.1. %2'lik Gluteraldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanması 33
3.6.2. Osmiyum Tetroksit Solüsyonunun Hazırlanması 34
3.6.3. Elektron Mikroskop Gömme Materyalinin Hazırlanması 34

3.7. CAM Doku Örneklerinin Elektron Mikroskop İle Değerlendirilmesi Takibi 34
3.10. Primer Dizaynı 35
3.11. CAM Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu 36
3.12. cDNA Sentezi ve RT-PCR 36
3.13. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar 38
4. BULGULAR 41
4.1. CAM Doku Örneklerinin Işık Mikroskop İle Değerlendirilmesi 41
4.2. CAM Doku Örneklerinin Elektron Mikroskop İle Değerlendirilmesi 48
4.3. CAM Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu 52
4.4. VEGF-A, VEGFR-2, FGF-2, FGFR-2, CNP-3 ve NPR-B mRNA Düzeylerinin Ölçülmesi 52
5. TARTIŞMA 54
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 58
7. KAYNAKLAR 59
8. EKLER 70
EK-1: T.C. Tarım Bakanlığı İzni 70
EK-2: Etik Kurul Onay Belgesi. 71
EK-3: Tezin İçeriğinden Yapılmış Yayın Ve Diğer Yayınlar 72
EK-4: Özgeçmiş 73

ÖZET

Tavuk Embriyosu Koryoallantoik Membran Modeli Kullanılarak Anjiyogenez Sürecinde Rol Oynayan Moleküllerin C-Tipi Natriüretik Peptid ile Olası İlişkisinin İncelenmesi

Tavuk koryoallantoik membran (CAM) modeli, anjiyogenez çalışmalarında gelişimsel süreçleri takip etmek için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Bu tez çalışmasında, CAM kullanılarak, embriyonik gelişimin 7. ve 20. günleri (E7 ve E20) arasında görülen anjiyogenez süreci ışık ve transmisyon elektron mikroskop analizleri ile takip edilmiştir. Ayrıca, aynı günlerde alınan CAM örnekleri kullanılarak, anjiyogenez mekanizmalarında görevli [Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)-A ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)-2] ve reseptörlerinin [Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR)-2 ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGFR)-2] yanı sıra, insan C-tipi natriüretik peptid (CNP) homoloğu olan tavuk CNP-3 ve reseptörü natriüretik peptid reseptörü (NPR)-B'nin mRNA ifade düzeylerinin zamana bağımlı değişimi analiz edilmiştir.

Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu analizleri, endotel tüp benzeri vasküler yapıları yoğun olarak E7-E8 günlerinde ve koryonik mezenşim içinde bulunduğunu göstermiştir. E9-E20 günler sürecinde ise mezenşim içinde yer alan vasküler yapıların progresif gelişimi, stabilizasyonu ve kompleks dallanması gözlenmiştir.

Bu vasküler gelişim sürecinde, VEGF-A ve FGF-2 mRNA ifadesi, CAM gelişiminin erken aşamalarında E7 ile E9 arasında ve E8'de pik yapacak şekilde gözlenmiştir. Bu moleküller, CAM gelişiminin geç döneminde, E16 civarında ikinci bir pik göstermiştir. CNP-3 mRNA ifadesi E16 ile E20 arasında VEGF-A ve FGF-2 mRNA ifadeleri ile eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. VEGFR-2 mRNA ifadesi E7-E12 arasında gözlenirken, FGFR-2 mRNA ifadesi ilk pikini E7-E9 arasında ve ikinci pikini E16-20 arasında göstermiştir. NPR-B mRNA ifadesi ise en yüksek seviyesi E16'da olmak üzere E7-E20 arasında gözlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler, CNP-3'ün özellikle CAM gelişiminin geç döneminde (E16-E20 günleri sürecinde), NPR-B reseptörü aracılığıyla, ileri vasküler organizasyonda rol oynayabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Anjiyogenez, koryoallantoik membran (CAM), CNP, CNP-3, NPR-B, VEGF-A.

ABSTRACT

Investigation of the Putative Relationship of Molecules which Playing a Role in the Angiogenesis with C-Type Natriuretic Peptide By Using the Chicken Embryo Chorioallantoic Membrane Model.

The chick chorioallantoic membrane (CAM) is a widely used model to follow the developmental processes in angiogenesis studies. This thesis study aims to describe the putative involvement of CNP-3, the chick homolog of human CNP, and its receptor natriuretic peptide receptor (NPR)-B besides known angiogenic factors and their receptors, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A/ vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 and fibroblast growth factor (FGF)-2/fibroblast growth factor receptor (FGFR)-2, in angiogenesis of the CAM.

CAM samples between developmental days E7 and E20 were collected for light microscopic and transmission electron microscopic analyses. Expression of CNP-3/NPR-B, VEGF-A/VEGR-2, FGF-2/FGFR-2 mRNA in these CAM samples were also studied between E7 and E20.

Light microscopy and electron microscopy analyzes showed that, vascular organization was mostly within the chorionic mesenchyme as endothelial tube-like structures on E7-E8 days. On E9 and later, advanced blood vessels were observed within the mesenchyme.

VEGF-A and FGF-2 expression were observed in the early stages of CAM development (E7-E9) with a peak at E8. These molecules showed a second peak at around E16. Co- expression of VEGF-A, FGF-2 and CNP-3 were seen at E16-E20. VEGFR-2 expression was observed between E7-E12, whereas expression of FGFR-2 showed its first peak between E7-E9 and its second peak between E16-20. NPR-B expression, on the other hand, was observed between E7-E20 with its highest level at E16.

In conclusion, the results revealed that CNP-3 may have a role in vascular organization via its NPR-B receptor in the later stages, i.e., E16-E20, of CAM development.

Key words: Angiogenesis, chorioallantoic membrane (CAM), CNP, CNP-3, NPR-B, VEGF-A.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ae	: Allantoik epitel
Ang-1	: Anjiyopoietin-1
Ang-2	: Anjiyopoietin-2
^{o}C	: Santigrat derece
ANP	: A-tip natriüretik peptid
Bç	: Baz çifti
BMP-4	: Kemik morfojenik protein-4
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
BNP	: B-tip natriüretik peptid
CAM	: koryoallantoik membran
Cdc42	: Hücre bölünmesi kontrol proteini 42
CNP	: C-tip natriüretik peptid
CNP-3	: C-tip natriüretik peptid-3
CO_2	: Karbondioksit
DLL4	: Delta-benzeri 4
En	: Endotel hücresi
EDHF	: Endotel Kaynaklı Hiperpolarize Etme Faktörü
Er	: Eritrosit
Eo	: Eozinofil
FAK	: Fokal adezyon kinaz
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FGF-2	: Fibroblast büyüme faktörü-2
FGFR-2	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 2
Flk1	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptör 2
Flt1	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptör 1
Flt4	: Vasküler endotel büyüme faktörü reseptör 3
GC	: Guanil siklaz
GTPaz	: Guanozin trifosfataz
HIF1-α	: Hipoksi uyarıcı faktör- α
Ig	: İmmunoglobulin
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
JAK	: Janus kinaz

MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
NEP	: Nötral endopeptidaz
NO	: Nitrik oksit
NPR-A	: Natriüretik peptid reseptör-A
NPR-B	: Natriüretik peptid reseptör-B
NPR-C	: Natriüretik peptid reseptör-C
Nrp-1	: Nörofilin-1
NT-BNP	: N-terminal B-tip natriüretik peptid
O_2	: Oksijen
PECAM-1	: Platelet endotel hücre adezyon molekülü
PDGF-β	: Platelet kökenli büyüme faktörü- β
PI3	: fosfotidilinositol 3
PKG	: Protein kinaz G
Prs	: Perisit
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
RT-PCR	: Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDF-1	: Stromal kökenli faktör-1
Src kinaz	: Sarkoma ilişkili kinaz
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TNF- α	: Tümör nekrosiz faktör- α
VE-kaderin	: Vasküler endotel-kaderin
VEGI	: Vasküler endotel inhibe edici faktör
VEGF-A	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A
VEGF-B	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü-B
VEGF-C	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü-C
VEGF-D	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü-D
VEGFR-1	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 1
VEGFR-2	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 2
VEGFR-3	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Kan damarlarının organizasyonu. A) Arterler, kapiller ve ven gösterimi. B) Enine kesit arter yapısının gösterimi "19 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir"..... 6
Şekil 2. 2. Anjiyogenez mekanizmalarının çeşitlerinin gösterimi "10 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir"..... 8
Şekil 2. 3. VEGF çeşitleri ve reseptörlerinin gösterimi "28 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir" 11
Şekil 2. 4. Koryoallantoik membran yapısının gösterimi. A) Yumurta içerisinde CAM yerleşimi "12 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir" B) CAM yapısının çizimi..... 19
Şekil 2. 5. Natriüretik peptidler ve reseptörlerinin gösterimi "81 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir"..... 25

Şekil 4. 1. A) E7'de koryonik ve allantoik epitel ve mezenşim görüntüsü B) Kan hücrelerinin görüntüsü. 41
Şekil 4. 2. A) E8'de arteriyol yapısının gösterimi. 42
Şekil 4. 3. E9'da CAM görünümü. 43
Şekil 4. 4. E10'da mezenşim kalınlığının ve koryonik epitel kalınlığının durumu 43
Şekil 4. 5. A) E11 CAM görünümü B) E12 CAM görünümü C) E13 CAM görünümü D) E14 CAM görünümü..... 44
Şekil 4. 6. A) E15 kalınlaşan mezenşim ve damarların görüntüsü B) E15 kan damarları ve koryonik epitel görüntüsü C) E16 muskular arter ve arteriyollerin görüntüsü D) E17 gelişmiş kan damarı ve arteriyol görüntüsü 45
Şekil 4. 7. A) E7'de yeni oluşan endotel tüp yapılarının mezenşim içerisinde görünümü B) E12'de koryonik epitel altında ve mezenşim tabakasında görülen vasküler yapılar C) E12'de mezenşimde görülen muskuler arter yapısı D) E13'de mezenşimde ven damarı..... 46
Şekil 4. 8. A) E15'te lümeninde eritrositler ve lümen etrafında belirgin tunika media bulunan müsküler arter yapısı komşuluğunda ven yapısının görüntüsü B) E16'da mezenşim tabakasında venöz yapılar ve gelişmiş müsküler arter görüntüsü C) E17 ve D) E19'da mezenşim tabakasında duvar yapısı gelişkin müsküler arter yapılarının

görüntüsü E) ve F) E20'de koryonik epitel altındaki mezenşim tabakasında yoğunlaşan lümeni ve duvarı belirgin arter ve ven damar yapılarının görüntüsü. 47
Şekil 4. 9. A) E7'de Koryonik epitelin iki katlı görünümü ve desmozomlar B) Koryonik epitele komşu lokalizasyonda kılcal damar yapıları C) Koryona komşu yerleşimli damar endotelinin yakınına yerleşmiş mezenşim hücresi ve belirgin GER yapısı D) Perinükleer bölgeye lokalize GER yapısı (kesikli ok) belirgin endotel ile çevrili kan damarı görüntüsü. 48
Şekil 4. 10. A) Mezenşim tabakasında kollajen lifleri B) Desmozomlar, lipid damlacıkları ve belirgin bazal membran C), D), E) Mezenşim içerisinde vasküler yapılar F) Endotel hücrelerinde oluşan sütun benzeri yapının görüntüsü. 49
Şekil 4. 11. A) E12'de koryonik epitel hücreleri arasında sayıca artan ve yüzeye yakın konumlanan kılcal vasküler yapılar B) nükleolus yapıları belirgin olan hücrelerin görünümü. 50
Şekil 4. 12. A) E15'de mezenşimde vasküler yapı B) Perisitler ile çevrili gelişmiş vasküler yapı. 50
Şekil 4. 13. A) E20'de mezenşim içinde arter benzeri gelişmiş vasküler yapı B) koryon epiteli komşuluğunda sayıca artış gösteren kapiller vasküler yapılar C) Mezenşim içerisinde bir vasküler yapı D) mezenşimde daha kalın bir duvara ve geniş lümene sahip kan damarı E) Koryonik epitelin yüzeyinde parmaksı çıkıntılar F) Desmozomlar ve lipid damlacıkları gözlenmiştir 51
Şekil 4. 14. Soldan sağa sırasıyla 100 bç DNA marker. 7., 8., 9., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 19., 20. günlerde gen ifadelenmesi A)VEGF-A ve VEGFR-2 RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü B) FGF-2 ve FGFR-2 RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü C) CNP-3 ve NPR-B RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü D) VEGF-A ve VEGFR-2 dansitometrik analizi E) FGF-2 ve FGFR-2 dansitometrik analizi F) CNP-3 ve NPR-B dansitometrik analizi 53

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. VEGFA, VEGFR2, bFGF, FGFR2, CNP, CNP-B gen ifadelenmesi için seçilen antikorlar. 35
Tablo 2. GAPDH ve CNP-3 için hazırlanan RT-PCR protokolü 37
Tablo 3. VEGFA, VEGR2, FGF2, FGFR2, NPR-B için hazırlanan RT-PCR protokolü 38

1. GİRİŞ

Vaskülogenez ve anjiyogenez embriyoda vasküler ağın oluşumunu ve gelişimini sağlayan iki temel süreçtir (1-5). Vaskülogenez, mezoderm kökenli anjiyoblastların farklanması sonucunda endotel ve primordiyal kan hücrelerine dönüşmesi, dolayısıyla *de novo* olarak ortaya çıkan primitif kan damarlarının oluşumu şeklinde tanımlanır (2-6). Öte yandan, anjiyogenez vaskülogenezden farklı olarak, önceden var olan kan damarlarından endotelyal proliferasyon ve migrasyon mekanizmaları ile yeni kan damarlarının oluşma sürecidir. Filizlenme ve intussusseptif olarak iki farklı anjiyogenez mekanizması tanımlanmıştır. Filizlenme şeklinde görülen anjiyogenez sürecinde endotelyal proliferasyon ve hücre göçü sonucunda endotelyal tüp oluşumu ortaya çıkar (2, 6-10). İntussusseptif anjiyogenez ise, önceden var olan damarların mikrovasküler büyümesinden kaynaklanır ayrıca vasküler ağın yeniden şekillenmesi ve genişlemesinden de sorumludur (9).

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesine ait mezoderm uyarıcı faktörler, paraksiyal ve lateral mezodermi anjiyoblastların ve hematopoetik hücrelerin oluşması için uyarır. Mezodermden köken alan anjiyoblastlar henüz lümen oluşturamayan ve bir araya gelerek kümeleşen vasküler endotel hücrelerin öncülleridir ve ilkel kan damarlarını oluştururlar. Bu sürece vaskülogenez denir (2, 3, 6). Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) etkisiyle anjiyoblastlar, endotel hücrelere farklanır. Burada en önemli nokta VEGF ligand molekülünün etki ettiği reseptörünün tipidir. Anjiyoblastlar, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2) ifade ederken; hematopoetik hücreler bu reseptörü oldukça az ifade ederler. Çevresel uyarılar sonucunda hematopoetik hücreler, kan hücrelerini oluşturacak hücrelerin öncüsü özelliğini gösterirken; anjiyoblastlar endotel hücrelerin öncüsü haline gelirler. Böylece VEGFR-2'nin ligand molekülü olan VEGF, anjiyoblastların endotel hücrelere farklanmasını sağlar ve vaskülogenez ile ilkel kan damarları oluşur (9).

İlkel kan damarlarının oluşumu sonrasında, endotel hücreler çoğalırlar ve lümen oluşumu ile kapiller ağ yapısı meydana gelir. Vaskülogenez ile oluşmuş varolan damar yatağından yeni damar oluşumu sürecine ise anjiyogenez denir (2). Anjiyogenez, embriyonik dönemde ve yetişkinlerde bazı fizyolojik süreçlerde görülen ve genellikle endotel hücrelerin filizlenmesi, göç etmesi, yeniden modellenmesi ve endotelin

etrafının perisitler ile sarılıp yeni damarın lümeninin oluşmasıyla ilerleyen karmaşık bir süreçtir. Filizlenme ve intussusseptif olarak iki farklı anjiyogenez mekanizması tanımlanmıştır. Filizlenme şeklinde görülen anjiyogenez sürecinde endotelyal proliferasyon ve hücre göçü sonucunda endotelyal tüp oluşurken (2, 6-10); intussusseptif anjiyogenez, önceden var olan damarların mikrovasküler büyümesinden kaynaklanır ve vasküler ağın yeniden şekillenmesi ve genişlemesinden de sorumludur (9). Bu süreçlerde belirleyici olan nokta, dokunun kanlanma özelliği yani dokunun metabolik özelliklerine bağlı olarak ihtiyaç duyduğu oksijenlenme durumudur. Buna bağlı olarak dokunun kanlanmasını ortamdaki büyüme faktörlerinin varlığı, konsantrasyonu gibi faktörler düzenler.

Anjiyogenez basamakları: vazodilatasyon, endotel geçirgenliğin artması/ periendotel desteğin bozulması, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu, kan damarı lümeni oluşumu, endotel farklanması, yeniden modelleme ile kapillerin etrafını saran damar düz kas hücrelerinin kan damarı etrafında toplanması (remodeling) şeklindedir (10). Bu süreçlerde görev alan moleküller ise anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler olarak iki başlık altında incelenir. Bu faktörlerin etkisi altında anjiyogenez denetlenebilir bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu faktörler arasında; vazodilatasyonda görevli olan nitrik oksit (NO), endotel hücre proliferasyonunda ve migrasyonunda görevli olan VEGF izoformları ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), anjiopoetin molekülleri bulunmaktadır.

Anjiyogenez araştırmalarında, gerek hücre kültürü çalışmaları gerekse deney hayvanları ile çalışılarak yapılan deneysel modeller kullanılmaktadır. Bu modellerin içerisinde en yaygın olanlarından biri tavuk koryoallantoik membran (CAM) modelidir (11).

CAM, gelişmekte olan tavuk yumurtası ile çalışılan bir doku örneğidir. CAM, allantoyis ve koryonun birleşmesiyle oluşan ekstraembriyonik bir membrandır. Ayrıca CAM, memelilerde bulunan allantoyise benzer şekilde gelişir; ancak kanatlılarda farklı olarak koryon ile birleşir ve böylece koryoallantoik membranı oluşturur (12, 13). Oldukça yüksek damarlanma özelliğine sahip CAM, başta birçok durumda anjiyogenezin gelişimsel olarak takip edilmesi adına çalışmalarda tercih edilir.

CAM ile yapılan çalışmalarda, anjiyogenezi uyaran faktörler olan bFGF, VEGF, hipoksi uyarıcı faktör-1 alfa (HIF-1α), stromal kökenli faktör-1 (SDF-1), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β) gibi faktörlerin ve biyolojik unusrların sıklıkla çeşitli deneysel modellerde çalışıldığı görülmektedir (14, 15, 16). Özellikle bu

faktörlerin gün ve gün ifadelenmesinin takip edilmesi anjiyogenez mekanizması ve tiplerinin anlaşılmasında önemlidir.

VEGF ve bFGF gibi yaygın bilinen anjiyogenik faktörlerin yanı sıra anjiyogenezde etkinliği araştırılmaya başlanan; ancak anjiyogenezde diğer faktörlerle ilişkisi tam olarak ortaya konmamış olan C-tip natriüretik peptidin de (memelilerde CNP, tavuk homoloğu CNP-3) son yıllarda çalışmalara konu olduğu görülmektedir (17).

CAM modeli kullanılarak gerçekleştirilen anjiyogenez çalışmaları incelendiğinde, gelişimin evrelerine göre, anjiyogenezin çeşitli aşamlarda sınıflandırılıdığı görülmüştür. Döllenmiş yumurtaların inkübasyonun beşinci ve yedinci günleri arası (E5-E7), damar büyümesinin esas görüldüğü evredir. E8-E12, intususeptif anjiyogenezin ön planda olduğu evredir ve E13-E14 herhangi bir ağ oluşumu ya da kompleks yapı oluşmaksızın damar ağının hacim ve kütlece büyüdüğü evredir (14).

Bu çalışmalarda sıklıkla kullanılan analizler; ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu ile doku morfolojisinin değerlendirilmesi ve moleküler düzeyde ilgili faktörlerin ifadelenmesinin bakılmasına yönelik olarak revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), western blot analizlerinin kullanılmasıdır. Hazırlanan bu tez çalışmasında ise bu yöntemlerden ışık mikroskop için hematoksilen&eozin boyama ve toluidin mavisi boyaması yapılması planlanmıştır. Daha detaylı görüntüleme yapılabilmesi adına elektron mikroskop görüntüleme için dokulardan ince kesitlerden hazırlanmıştır. Gen ifadedelenmesi revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile VEGF, bFGF ve CNP faktörleri ve ilgili reseptörleri için çalışılmıştır.

“CNP, anjiyogenik süreci ilerleten ve damar stabilizasyonunu sağlayan bir faktör olarak gelişimsel süreçte VEGF ve bFGF ile etki gösterir” hipoteziyle yola çıktığımız tez çalışmasının amacı: CNP’nin anjiyogenez sürecinde rolü olup olmadığının oratya konması ve VEGF, bFGF ile etkileşiminin anjiyogenez çalışma modeli olarak tavuk embriyo koryoallantoik membran modeli kullanılarak ortaya konmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vasküler Sistem Histolojisi ve Gelişimi

Kardiyovasküler sistem omurgalılar şubesine ait canlıların embriyosunda fonksiyonellik kazanan ilk sistemdir. Embriyonun basit difüzyon ile ihtiyaçlarını artık karşılayamadığı noktada doku ve organ sistemlerinin gelişimine bağlı olarak artan ihtiyaçların karşılanması kardiyovasküler sistemin oluşumu ile sağlanır. Bu sistemin esas fonksiyonu gaz değişimi, besin sağlamak ve atık ürünlerin uzaklaştırılması şeklinde sıralanabilir. Embriyo geliştikçe, kardiyovasküler sistem lenf düzenlenmesinde, endokrin sistemin fonksiyonellik kazanmasında ve immünolojik denetlemede görev alır (18, 19).

Gelişimsel sürecin başında embriyo vaskülarizasyona sahip değildir ve besin ihtiyacını difüzyon aracılığıyla sağlar. Embriyo hızlı ve birbirini takip eden gelişimsel olaylar sonucunda yüksek vaskülarizasyona sahip bir organizma haline gelir. Bu noktada embriyonun sağkalımı fonksiyonel ve kompleks kapiller pleksusun ve kan damarlarının oluşumuna bağlı hale gelir (4). Vaskülogenez, endotel hücre öncüsü (prekursörü) olan anjiyoblastların belirli bölgelere göç ederek burada *in situ* farklanması ve endotel kordlar şeklinde primitif vasküler ağ yapısını oluşturmasıdır (4, 20). Bu süreçte görevli olan çok sayıda büyüme faktörü vardır. Bunlardan, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve kemik morfojenik protein 4 (BMP-4) paraksiyal ve lateral mezodermi bipotent karakatere sahip hemanjiyoblastlardan anjiyoblastların ve hematopoetik hücrelerin oluşumu için uyarır. Anjiyoblastlar, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) etkisinde endotel hücrelere farklılaşır. Burada en önemli nokta VEGF ligand molekülünün etki ettiği reseptör tipidir. Anjiyoblastlar, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2, Flk1) ifade ederken; hematopoetik hücreler bu reseptörü oldukça az ifade ederler. Dolayısıyla, hematopoetik hücreler kan hücrelerini oluşturacak hücrelerin öncüsü konumuna gelirken; anjiyoblastlar endotel hücrelerin öncüsü konumuna gelirler. Böylece VEGFR-2'nin ligand molekülü olan VEGF, anjiyoblastların endotel hücrelere dönüşmesini sağlar ve vaskülogenez ile ilkel kan damarları oluşur (9, 20).

Hematopoetik hücrelerin ve anjiyoblastların reseptörlerinin birbirinden farklı olması bu iki hücre tipinin farklanma süreçlerini etkilediği gibi embriyonik dönemde

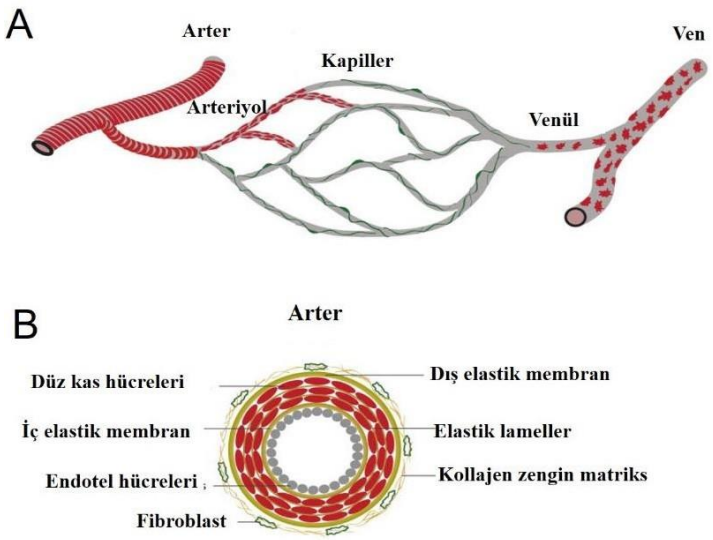
bu iki hücre hattının toplandığı noktaları da etkiler. Anjiyoblastlar, direkt dorsal aortada ve kardinal vende agregatlaşma yaparlar ve bu durum anjiyoblast farkalanması ile oluşan kapiller pleksus ağının endokardiyal tüp yapısına dönüşmesinde rol oynar (4, 20). Yapılan çok sayıda çalışmada, anjiyoblastların vasküler yapıyı oluşturan unsurlara farklanmasında VEGFR-2 ve bunun ligandı olan VEGF-A'nın önemi gösterilmiştir. VEGFR-2 *knockout* farelerde yapılan deneylerde anjiyoblastların bu reseptöre sahip olmadığı durumlarda kan adacıklarının oluşamadığı yani hücrelerin agregat oluşuturamadığı ve vasküler gelişimin tamamen etkilenerek gelişimin ilerlemediği ve embriyonun ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir (21, 22). VEGF-A *knockout* olan farelerde genin bir kopyasının silinmesinde bile embriyonik ölümün gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca bir diğer VEGF reseptörü olan vasküler endotel büyüme faktörü reseptör-1 (VEGFR-1; flt1) ile yapılan çalışmalarda bu reseptörün gelişimin erken evresinde etkili olduğu gösterilmiştir. VEGFR-1 yokluğunda özellikle endotel hücrelerde anormal gelişim ve vasküler yapıda düzensizlik olduğu gösterilmiştir (23, 24).

Yetişkinlerde, her bir organın vasküler organizasyonu, organın fizyolojik özelliklerine uygun şekilde bir dizi damar ağı ile oluşturulur. Kan damarlarının morfogenizi de çevreledikleri dokunun ihtiyaçlarına göre düzenlenir ve buna bağlı olarak kan damarlarının hem endotel hücrelerden oluşan endotelyum tabakası hem de düz kas hücrelerinden ve perisit hücrelerinden oluşan damar duvarının şekillenmesinde çok sayıda mekanizma görev alır. Kardiyovasküler sistem hiyerarşisini, farklı şekillerde oluşan her bir damarın kendine özgü yapısı belirler (19).

İnsanda vasküler organizasyon temel olarak üç ana damar sistemine ayrılır. Bunlar: arteriyel, venöz ve lenfatik sistemdir. Arteriyel (atardamara ait) sistem, pulmoner arter veya dorsal aort gibi daha büyük arterler şeklinde başlar ve giderek daha küçük çaplı arterlere, arteriollere ve kapillere doğru giden bir sistemle kanı kalpten uzaklaştırır (Şekil 2.1-A). Arterler bu şekilde kanı kapten toplayarak sistemik veya pulmoner dolaşıma iletir. Buna karşılık, küçük arteriyoller, oksijen (O_2) ve karbondioksitin (CO_2) yanı sıra besinler ve metabolik atık ürünleri dokularda değiştiren kapilleri besler (18, 19). Venöz sistem ise kanı kapillerden toplayarak ve giderek daha büyük venüller ve venler aracılığıyla kalbe geri taşır (Şekil 2.1-A). Lenfatik damar sistemi ise, dokulardan ve organlardan interstisyel sıvıyı alır ve subklavyen damarlara drenaj yoluyla bu sıvıyı geri vererek dolaşıma geri döndürür.

Bu üç vasküler organizasyon şekli dolaşım sistemini oluşturan kapalı bir damar sistemini meydana getirir (18).

Vasküler sistemdeki damarların heri biri farklı hücre tiplerinden oluşur. Damarların iç tabakasını tek katlı yassı epitel hücreleri olan endotel hücrelerinin meydana getirdiği endotelyum adı verilen tabaka oluşturur (Şekil 2.1-B). Endotelyum, damarın lümen tabakasının etrafını çevreler. Küçük damarlarda ve kapillerde endotelyum damar düz kas hücreleri ve perisitler tarafından desteklenir; ancak bu hücreler sık değil seyrek olarak görülür. Arteriyoller az sayıda düz kas tabakasıyla çevriliyken; kapiller düz kas hücreleri yerine devamlılık göstermeyen perisitler ile çevrilidir. Bu destekleyici iki hücre tipi olan düz kas hücresi ve perisitlere genel olarak mural hücreler adı verilmektedir ve bunlar damarın lümen harici tarafıyla ilişki halindedir. Daha büyük arter ve venlerde ise içte endotelyum (tunika intima) kalın, etrafında stabilize edici bir düz kas hücre tabakası (tunika media) tarafından ve en dışta bağ dokusu, kollajenden oluşan bir tabaka (tunika adventisya) ile çevrili olan daha karmaşık bir yapı kazanır (Şekil 2.1-B). Tunika media, dairesel olarak dizilen düz kas hücrelerinden oluşur ve büyük elastik arterlerde, çok sayıda dairesel düz kas tabakası, elastik lamel halkaları ile dönüşümlü olarak bulunur. Tunika adventisya, hem arterlerin hem de venlerin en dışında ekstraselüler matriks ile devamlılık gösteren, fibroblastları ve öncül hücreleri içeren bir tabakadır (Şekil 2.1) (18, 19, 25, 26).



Şekil 2. 1. Kan damarlarının organizasyonu. A) Arterler, kapiller ve ven gösterimi. B) Enine kesit arter yapısının gösterimi "19 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir".

Kan damarı duvarının morfogenezi ve homeostazisi, belirli genlerin ifadesini ve hücresel sinyal mekanizmasının titizlikle işlenmesine ihtiyaç duyar. Sinyaller aracılığı ile bir orkestranın yönetilmesi gibi ardışık olarak vasküler hücrelerin göçü, proliferasyonu, apoptozu, farklanması ve ekstraselüler matriksin sentezi düzenlenir (19). Böylece bir çok patolojik veya fizyolojik koşulda dinamik bir şekilde damarın metabolik ihtiyaçlarına göre kan akışı değiştirilerek kronik veya akut adaptasyonlar sağlanır. Akut adaptasyonlar, kan damarı çapının kasılma ya da gevşeme sinyallerine uygun olarak mural hücreler tarafından değişmesidir. Böylece değişen damar çapı ile birlikte kan akışında değişiklikler meydana gelir. Kronik değişiklikler ise, vasküler sistemin yeniden düzenlenmesini gerektirir. Bu değişiklikler, kan damarlarının yeniden modellenmesi süreçlerini içerir. İlginç bir şekilde, bu olaylar embriyoda fonksiyonel dolaşım sistemini kurmak için gerekli olmasına rağmen, erişkin hayatta da organizmanın yaşamı boyunca aktivitesini sürdürür (18). Vasküler sistem, bu adaptasyonları fizyolojik veya patolojik süreçlerde sağlayan ve organizmanın yaşamını sürdürmesi için en gerekli ve dinamik sistemlerden biridir.

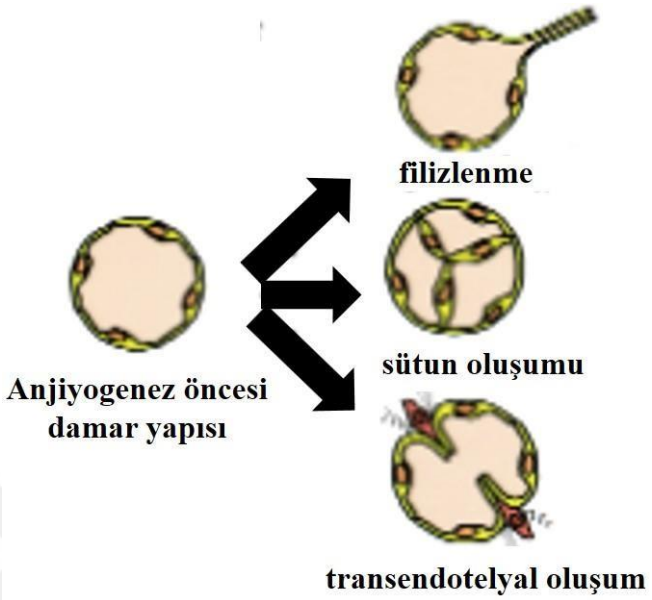
Dolaşım sisteminin gelişimi, avasküler bir yapının vasküler hale gelmesi sürecini ve olgun damarların oluşumunu içerir. Bu süreçte en önemli temel nokta, endotel hücrelerin farklanması ve sonrasında bunların özelleşerek büyüyen damar yapılarına katılması ve anjiyogenezi uygun şekilde gerçekleştirmesidir.

2.2. Anjiyogenez

İlk kan damarları yukarıda ifade edildiği üzere embriyoda vaskülogenez ile oluşmaktadır. Anjiyogenez ise daha önce varolan vasküler ağ yapısından filizlenen ve ayrılan damarların yeni damarları oluşturma sürecidir. Anjiyogenez ile ilkel vasküler ağ yapısı yeniden modellenerek daha sonra insan vücudunda yaklaşık yüz bin kilometre toplam damar uzunluğa sahip olan dolaşım sistemini oluşturur (10, 20, 27, 28)

Anjiyogenez, ilk olarak varolan postkapiller venüllerden endotel hücrelerin filizlenerek büyümesi şeklinde tanımlanmıştır (29). Ancak günümüzde varolan primitif vasküler ağ yapısının büyüyerek daha kompleks bir vasküler yapıya yeniden modellenmesi şeklinde tanımlanır. Bu modellenme iki tip anjiyogenez sürecini içerir. İlki; yaygın olarak bilinen ve endotel hücrelerinin filizlenerek proliferasyona uğramasını takip eden süreçtir. İkincisi ise, periendotel hücrelerin sütunlar şeklinde

bölünerek veya vasküler yapıların transendotelyal köprülerle birbirlerine bağlanmasıyla gerçekleşir ve bu tip anjiyogeneze intususeptif anjiyogenez denir (10) (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Anjiyogenez mekanizmalarının çeşitlerinin gösterimi "10 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir".

Endotel hücrelerin filizlenmesi ile başlayan anjiyogenez sürecinde, perisitler ile çevrili ve bazal membran üzerine oturmuş endotele dahip damarlarda anjiyogenik sinyalin gelmesiyle perisitlerin birbirinden ayrılması ve bazal membranın yıkılması gözlenir. Anjiyogenik sinyal, endotel hücrelerinin fonksiyonel ve morfolojik olarak karakteristik hücreler olan uç hücrelere (tip cells) veya sap hücrelere (stalk cells) farklanmasını sağlar (30, 31). Uç hücreler filopodya (ince ipliksi uzantı) oluşturarak anjiyogenik uyarımın olduğu yöne doğru filizlenir. Bu hücreler yüksek düzeyde Delta-benzeri Notch ligand 4 (DLL4) ifade etmeleri ile karakterizedir. Düşük DLL4 ifadesi az proliferasyon ve vasküler lümenin oluşmaması ile ilişkilendirilir. Sap hücreler, uç hücreleri takip ederler ve bunlar daha çok Notch1 ifade ederler ve proliferasyonları fazla olup yeni oluşan filizlenmenin ilerlemesini destekler (5, 27,33, 34).

Endotel hücrelerin uç ya da sap hücre olarak özelleşmesindeki en önemli anjiyogenik faktör VEGF-A ve Notch yolağının aktivitesidir. VEGF-A'ya cevap olarak kan damarlarında sessiz fazda bulunan endotel hücrelerden bir kısmında DLL4 ifadesi artar ve uyarının geldiği yöne doğru göç etmeye başlarlar. Bu noktada DLL4

ifadesi artan bu hücreler komşu hücrelerinde Notch sinyal yolağını DLL4-Notch1 etkileşimini kullanarak aktive ederler ve Notch yolağının aktive olduğu bu hücrelerde uç hücre olma özelliği baskılanır ve bu hücreler sap hücreler haline gelir (33, 34). Notch sinyal yolağı, VEGFR-2 ifadesini ve onun birlikte bulunan reseptörü olan nörofilin-1 (Nrp-1) ifadesini azaltır ve VEGFR-1 ifadesini arttırır ve bu durumda endotel hücrelerde VEGF-A'ya karşı oluşturulan cevap azalır. Endotel hücreler arasındaki bu uç ve sap hücre tipine dönüşüm stabil olmayıp bir hücre diğer hücre tipine mikroçevresindeki VEGF-A ve DLL4–Notch1 arasında oluşacak etkileşime göre farklanır (5).

Filizlenen endotel hücrelerin birbirleriyle anastomozlar yaparak, stabilite kazanarak yeni damarlar oluşturması gerekmektedir. Bunun için en önemli faktör ise, endotel hücrenin büyümesini ve hareketini hücre-hücre etkileşimi ile sağlayan vasküler endotelyal (VE)-kaderindir (5, 35). Hücre-hücre etkileşimine en önemli etki kan akımına bağlı oluşan kayma gerilimi (*shear stress*) ile olur. Bu sayede, mekanik sinyaller endotel hücrelerin gen ifadelenmesini ve hücre fonksiyonunu etkileyen biyokimyasal sinyallere çevrilir. Endotel hücreler tarafından salınan platelet-kökenli büyüme faktörü-B (PDGF-B), perisitlerin yeni oluşan kan damarı etrafında toplanmasına ve anjiopoietin-1 ile bu damarların stabil kalmasına neden olur. Stabil haldeki damarın lümenini döşeyen endotel hücreleri proliferatif olmayan sessiz faza geçerler. Bu hücrelere, falanks endotel hücreleri de denir ve bu hücreler arasındaki adheransın ve VE-kaderin ifadesinin artmasıyla damarlar stabil durumlarını tamamlarlar (5, 36).

İntususepsiyon anjiyogenez mekanizması ise daha az aydınlatılmıştır. Transluminar doku sütunlarının varolan kan damarları içerisinden gelişip birleşmesi ve dolayısıyla varolan damarlardan yeni damarların bölünme yolu ile oluşması intususeptif anjiyogenez olarak tanımlanır (37). Bu mekanizmanın filizlenme ile oluşan anjiyogeneze göre farkı, damarın yüzey alanını ve hacmini endotel hücre bölünmesi ve ekstraselüler matriks yıkımı olmaksızın arttırmasıdır. Süreci izlemek için herhangi spesifik bir işaretlemenin hücreler üzerinde yapılamaması nedeniyle intususepsiyon anjiyogenez mekanizmasının gözlemlenmesi zor bir durumdur. Sürecin muhetemelen mekanotrandüksiyon uyarımlarla başladığı düşünülmektedir. Sadece görüntüleme yöntemleri ile sürecin izlenmesi söz konusudur (5, 38).

Anjiyogenez kritik bir süreç olarak hem embriyoda hem de erişkin hayatta görülür. Ancak erişkin hayatta fizyolojik süreçte yara iyileşmesi veya dişi üreme

sisteminin aylık döngüsü haricinde görülmesi kanserde metastaz gibi patolojik süreçlerle ilişkilendirilir. Dolayısıyla embriyoda ve erişkinde anjiyogenezin moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla evrelerinin incelenmesini farklılıkların ortaya konmasını sağlayacaktır.

2.2.1. Anjiyogenezde Görevli Büyüme Faktörleri

Anjiyogenez çok sayıda büyüme faktörünün üstelik birbirleriyle etkileşim halinde olarak gerçekleştirdikleri karmaşık moleküler bir süreçtir. Anjiyogenez süreci aktivatör ve inhibitörlerinin arasındaki denge ile kontrol edilir. Buna bağlı olarak endotel hücreler ile ilgili olarak anjiyogenik büyüme faktörlerinin inhibe edici ve aktive edici rolleri yoğun olarak çalışılmaktadır.

1970'li yıllarda tümör anjiyogenezi çalışmalarına yoğunlaşılmasıyla birlikte özellikle *in vitro* koşullarda endotel hücrelerin kan damarı kapillerine dönüştüğü görülmüştür ve çalışmalarda anjiyogenezde görevli diğer büyüme faktörlerinin yanısıra özellikle VEGF ve bFGF ön plana çıkmıştır (39). Gerek vasküler gelişimin izlenmesi için gerekse gelişimsel veya patolojik süreçlerin modellenmesinde anjiyogenez açısından bu büyüme faktörlerinin ve moleküler mekanizmalarının çalışılması söz konusudur.

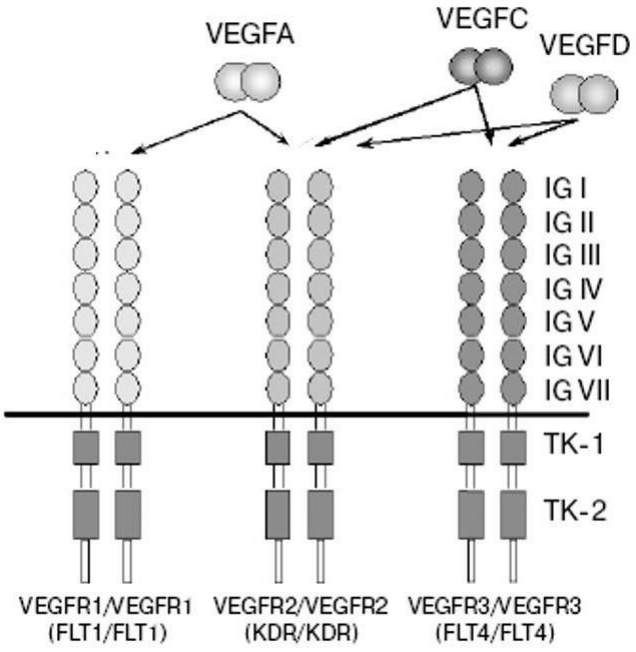
VEGF, PDGF ailesine ait bir büyüme faktörüdür. Yaklaşık 40kDa ağırlığında, birbirine sistein bağları ile bağlı aminoasit zincilerinden oluşan bir glikoproteindir. Memelilerde VEGF -A, -B, -C ve -D çeşitleri bulunmaktadır. Bu çeşitliliği, proteinin *alternatif splicing* sürecinde geçirdiği ve post-translasyonel modifikasyonlar olarak geçirdiği proteolitik klivajlar sağlar ve böylece birbirinden farklı sinyal özelliklerine sahip izoformlar oluşur. Örneğin VEGF-A_{165b} ekzon 9 tarafından sentezlenmektedir ve ekzon 8 tarafından sentezelenen izoformu ile endotel hücre kültürüne eklendiğinde VEGF etkisini inhibe etmektedir (40).

VEGF, vasküler geçirgenliği ve endotel hücre proliferasyonunu arttırır. Vasküler geçirgenlik üzerindeki etkisini endotel nitrik oksit sentaz aktivasyonula gösterir ve böylece özellikle infalamasyon, yara iyileşmesi durumunda vazodilatasyonu ve damarın tonusunu etkiler (41, 42).

VEGF gen ifadesinin düzenlenmesi genel anlamıyla özellikle hipoksik koşullardan etkilenir; ancak dikkatle üzerinde durulması gereken nokta embriyonik ve yetişkin anjiyogenez mekanizması arasında VEGF sinyal yolağına bağlı farklılık

olduğudur. Embriyonik endotelyum için VEGF, doz-bağımlı şekilde endotel hücrelerde sağ kalımı sağlarken; çoğu yetişkin dokuda kan damarlarının stabilizasyonu ancak ve ancak VEGF ifadesinin azaltılması ile sağlanır (43).

VEGF biyolojik fonksiyonunu ligand molekül olarak tip III reseptör tirozin kinazlara (TK) bağlanarak gösterir. VEGR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4) bu kinaz ailesinin üyeleridir (44). Reseptörler immunoglobulin (IG)-benzer domain, transmembran domain, düzenleyici membrana bitişik bulunan domain, hücre içi domain, tirozin rezidüleri taşıyan kinaz domaini içerir ki bunlar sinyalin iletilmesinde görevlidir. Bu reseptörler, kemik iliği kökenli hematopoetik hücrelerin, makrofajların ve endotel hücrelerinin yüzeyinde ve bazı malignant hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilir. VEGF-A, VEGFR-1'ye bağlanarak özellikle gelişimsel dönemde anjiyogenezi düzenlerken; VEGFR-2'ye bağlanarak hem embriyoda hem de erişkinde anjiyogenezi düzenler. VEGF-C ve VEGF-D ise VEGFR-2 ve -3'e bağlanır. Bu noktada her ikisi de VEGFR-2'ye bağlanan VEGF-A ve VEGF-C arasındaki farkı vurgulamak gerekmektedir. VEGF-A, kan damarı oluşumu için gerekliyken; VEGF-C lenfatik damarların oluşumu için gereklidir (Şekil 2.3) (45).



Şekil 2. 3. VEGF çeşitleri ve reseptörlerinin gösterimi "28 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir".

VEGR-2, VEGF'nin esas görevi olan büyüme ve geçirgenliğin arttırılmasında görevlidir. VEGR-1 ise tam tersi yönde etki ederek VEGFR-2'nin *decoy* reseptörü veya sinyal baskılayıcı reseptörü olarak etki eder. VEGR-2 taşımayan fareler kan damarı organizasyonu oluşturmazken; VEGFR-1 taşımayanlar ise anormal genişlikte damarları oluşturan endotel hücre oluşumlarına sahiptir ve bunların vaskülarizasyonu anormaldir. VEGR-1 ifadesi kinaz domainini ifade etmeyecek şekilde oluşturulan fare deney modelinde (truncated VEGR-1) bu reseptörün etkinliğini normal halinde olana göre gösteremediği görülmüştür. VEGFR-3 ise kan damarları gelişiminde önemli fonksiyona sahip olsa da esas görevi lenfogenezdir ve lenf damarlarında ifadelenmesi son derecede önemlidir (42).

Fibroblast büyüme faktörü, endotel hücre mitojeni olarak bilinmektedir. İlk bulunduğunda fibroblastlar üzerinde mitojen etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (46). Sonrasında ise mezodermal kökene sahip olan vasküler endotel hücreleri de içeren popülasyon üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Endotel hücre mitojen olmasındaki rolüyle bağlantılı olarak *in vitro* ortamda anjiyogenik uyarımdaki etkinliği de tavuk koryoallantoik membran (CAM) modeli ve tavşan kornea analizleri ile gösterilmiştir (47, 48).

Endotel hücreler üzerinde ve anjiyogenez sürecinde dramatik olarak etkili bir diğer büyüme faktörü, TGF-β'dir. Plateletlerde diğer hücrelerde bulunduğu konsantrasyonuna göre daha çok bulunur ve yara iyileşmesi, tromobogenez ve damar duvarı sürdürülebilirliğinde görev alır. TGF- β, endotel hücreler üzerinde mitojenik etkiye sahip değildir; ancak anjiyogenezi ve fibrozisi yara iyileşmesi sırasında uyarır. Bu süreçte TGF-β endotel hücerelerden bFGF gibi büyüme faktörlerinin veya başka kemotaktik faktörlerin salınmasını sağlamaktadır (47).

2.2.2. Anjiyogenezin Moleküler Mekanizması

Anjiyogenez aşağıda belirtildiği üzere birbiri ile ilişkili basamakların oluşturduğu çok adımlı bir süreçtir.

Vazodilatasyon, endotel geçirgenlik ve periendotel desteğin dağılması filizlenen anjiyogenezde ilk adımdır. Bu adımda damar geçrigenliğinin oluşmasında VEGF ve NO görevlidir. VEGR-2 ise baskın olan reseptör tipi olarak tüm anjiyogenez basamaklarında düzenleyici olarak görev alır. Geçirgenlikteki artışa endotelde pencerelerin oluşumu (fenestrasyon), vezikülo-vakuolar organellerin oluşumu ve

trombosit endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1) ve VE-kaderinin yeniden düzenlenmesi eşlik eder. Ayrıca endotel hücre göçü için oldukça önemli olan sarkoma-ilişkili kinaz (Src kinaz) birikimini de sağlar. Geçirgenlik anjiyogenez için istenen bir durum olsa da; bunun aşırı düzeyde olması dolaşım sisteminde hasara, intrakraniyal hipertansiyona, metastazise, premenstrual dönemde rahatsızlığa ve körlüğe sebep olabilir. Bu noktada anjiopoietin-1 (Ang-1) ligandı ve onun reseptörü Tie2 zaten varolan damarların sıkılığını sağlayan unsur olarak vasküler geçirgenlik inhibitötü olarak devreye girerek bir dengenin oluşmasını sağlar (10, 49). Ang-1 erişkin dokularda endotelden kaynaklanan plazma sızıntılarına karşı akut olarak uygulandığında sızıntıyı vasküler morfolojide değişiklik olmaksızın engellemiştir. Ang-2 ise Tie2'nin oluşturduğu sinyalin inhibitörüdür ve düz kas hücrelerinin periendotel bölgeden ayrılmasına ve matriksin gevşemesine neden olur. Bu sayede gevşeyen matriks yapısı içerisinde endotel hücrelerin göç etmesi daha kolay hale gelir. Ekstraselüler matriksin yıkımında görev alan proteazların etkisiyle sadece endotel hücrelerin göç etmesi için bir oda yapısı oluşturulmaz; aynı zamanda matriks içerisinde depolanan bFGF, VEGF, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1) salınımı da mümkün hale gelir (4).

Endotel hücre proliferasyonu ve göçü (migrasyonu) yine VEGF kontrolü ile ilerleyen anjiyogenezin ikinci adımıdır. Bu adımda endotel hücresindeki aktin filamentlerinin düzenlenişi önemlidir. VEGF, fokal adezyon kinaz (FAK) fosforilasyonunu düzenler ve bunun akitvasyonunu sağlayarak hücre iskelet proteini olan talin, vinkulinin fokal adezyonda birikmesine neden olur. FAK aktivasyonu, protein kinaz-C sinyaline (PKC) gereksinim duyar. Src-bağımlı FAK fosforilasyonu ile hücre göçü için fosfotidil inositol 3 aktivasyonu da sağlanır. VEGFR-2 aktivasyonu ile ortama gelen VEGF-ilişkili protein/T-hücre-spesifik adaptör molekül (VRAP/TsAd) ise Src kinaz, fosfatidilinositol-3 (PI3) kinaz ile etkileşim kurarak aktin organizasyonuna ve hücre göçüne sebep olur. Siklin-bağımlı kinaz-42 (Cdc42)'nin aktivasyonu ise stres-aktive protein kinaz/ protein38 (SAPK/p38) fosforilasyonuna sebep olur ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) -2 ve -3 fosforile olur ve aktin filamentleri yeniden organize olur, endotel hücreden de lamellipod uzantıları çıkar ve hücre göçü ilerlemiş olur. Ayrıca aktin orgainzasyonuna küçük guanin tirifosfataz (GTPaz) molekülleri olan Rho ve Raz etki eder. Bunların aktin dinamiklerini etkilemesiyle hücre göçü sırasında hücrenin kontraktil hareketi de kontrol edilir (45).

Lümen oluşumu adımında ise, endotel hücreler sıklıkla solid kordlar şeklinde biraraya gelir ve sonuçta lümene sahip bir yapı kazanır. Endotel hücre interkalasyonu veya kalınlaşması ve varolan damarlarla birleşmesi damarların çapının ve uzunluğunun artmasını sağlar. Ang1 ve VEGF izoformları birlikte lümen oluşumunu sağlar. $VEGF_{189}$ luminal çapı azaltır; $VEGF_{121}$ ve $VEGF_{165}$ ise lümen oluşumunu ve damar uzunluğunu da arttırır. İzoformların bu etkisi vasküler morfolojiyi düzenler (44, 50).

Endotel hücreleri lümen oluşturmak üzere biraraya geldikten sonra belirli bir stabilizasyon kazanırlar ve yıllarca sessiz bir fazda kalabilir. Bu durum endotel hücrelerinin sağkalımı ile sağlanır. Hemodinamik kuvvetler ise endotel sağkalımı için en önemli etkenlerinden birisidir (51). Vasküler dokuların karşı karşıya bulunduğu dört temel mekanik stres faktörü şunlardır: 1- Kayma gerilimi (shear stress). 2- Lümen basıncı. 3- Mekanik stres. 4- Boylamsal düzlemde gerilim (52). Fizyolojik kayma gerilimi kuvveti endotel hücrelerde tümör nekrozis faktör (TNF)-aracılı uyarılan apoptozu engeller ve sağkalımı arttırır. Endotel hücre apoptozu NO, reaktif oksijen türleri (ROS), vasküler endotel inhibe edici faktör (VEGI) ile uyarılır. VEGF, Ang1 gibi endotelyal faktörler p53, p21, p16, p27 ve *Bax* gibi genlerin ifadelenmesini baskılar ve PI3-kinaz/Akt, p42/44 mitojen aktive kinaz, Bcl-2 gibi moleküllerin görev aldığı sağkalım ile ilgili sinyal yolaklarını aktive eder (53, 54).

Endotel farklanması, lokal fizyolojik gereksinimlere göre endotel hücresinin özelleşmiş karakterler kazanması ile gerçekleşir. Bu durum tamamen kanlanan dokunun metabolik özelliğine bağlıdır. Örneğin endokrin organlarda endotel pencereli (fenestre) bir yapı kazanarak devamlılık göstermeyen bir tabaka halini alır ve bu şekilde partikül değişimi sağlanır (10). Düz kas hücre birikmesi ve gelişmesi ise düz kas hücreleri için kemoatraktan olan PDGF-BB ile uyarılır. Aynı zamanda, VEGF mural hücrelerin sayısının artmasını VEGF reseptörlerine bağlanarak veya PDGF-BB salınımını uyararak sağlar. Ang1 ve Tie2 endotel hücre ve mural hücre etkileşimini sağlayarak kan damarı stabilizasyonunun sürdürülmesine yardımcı olur. TGF-β1, TGF-β2 ve Smad5 damar olgunlaşması üzerinde pleiotropik etki gösterir: bunlar endotel hücre proliferasyonunu, farklanmasını inhibe eder, düz kas farklanmasını uyarır ve ekstraselüler matriks sentezimi uyarır (10).

2.2.3. Anjiyogenez Çalışmalarında Kullanılan Deneysel Modeller

Anjiyogenez, gelişimsel süreçte olduğu kadar erişkinde ve özellikle metastaz gibi patolojik süreçlerde, iskemiye bağlı kalp-damar hastalıklarının tedavisinde anlaşılması gereken bir süreçtir.

Dolaşım sistemi ile ilgili hastalıklara bağlı ölüm oranlarının dünyada ve ülkemizde yıldan yıla artış gösterdiğini ve ölüm nedeni olarak birinci sırada yer aldığını hem Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerinden, hem de Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerinden görmekteyiz. Dünya Sağlık Örgütü 2019 yılı verilerine göre, başta gelen on hastalık arasında ilk sırayı iskemik kalp hastalıkları almaktadır (55). TÜİK 2018 ölüm istatistikleri, %38.4 oranı ile ilk sırada yine dolaşım sistemine bağlı hastalıkların yer aldığını ortaya koymaktadır (56) .

Kalp damar hastalıkları çoğunlukla ateroskleroz olarak bilinen ve arterlerin duvarındaki plaka oluşumuna bağlı oluşan damar tıkanıklıkları ile ilişkilendirilir. Bu durumda kan akışında problemler oluşmaya başlar ve dolaşım sistemine bağlı olarak görülen kalp krizi, felç, periferik arter hastalıkları gibi rahatsızlıklar ortaya çıkar.

Periferik arter hastalıkları, alt ekstremiteyi besleyen ana damarlardaki tıkanmaya bağlı olarak görülen ve bacak iskemilerine sebep olan oldukça ciddi bir dolaşım sistemi hastalığıdır. Periferik arter hastalıklarına yönelik olarak oluşturulan hayvan iskemi modelleri ile bu iskemik bölgeye hücre uygulamaları yapılarak bölgenin yeniden damarlanmasına bağlı olarak beslenmesini hedefleyen deneysel çalışmalar bulunmaktadır (57, 58, 59). Bu çalışmalarda gerek hücre uygulamaları gerekse büyüme faktörlerinin kullanılmasıyla oluşturulan deneylerde hedeflenen, anjiyogenez mekanizmasının terapötik amaçlara yönelik olarak ortaya konmasıdır.

Anjiyogenez ile ilgili çalışmalar hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak gerçekleştirilir. Endotel hücrelerinin kullanıldığı ve migrasyon, proliferasyon gibi hücresel süreçlerin çalışıldığı, kollajen ve fibrin gibi ekstraselüler hücre birleşenleri ile 3 boyutlu hücre kültürü ortamlarında sürdürülen çalışmalar, *in vitro* çalışma örnekleridir. Matrijel veya aljinat dolguların deney hayvanına implantasyonunu içeren, anjiyogenik uyarımın çalışıldığı kornea anjiyogenez analizi, anjiyogenik ya da anti-anjiyogenik moleküllerin etkisinin çalışıldığı veya anjiyogenezin doğal ilerleyişi ile ilgili mekanizmaların çalışıldığı koryoallantoik membran (CAM) analizleri ise *in vivo* çalışma örnekleridir. Bunlara ek olarak, sadece endoteli değil; aynı zamanda çevresindeki hücre popülasyonunu ve dokuları içeren çalışmaların yapıldığı ve aortik

halka analizleri denilen, aortun disseksiyon ile çıkarılıp sonrasında genellikle kollajen içerikli bir matriks içerisine gömüldüğü ve anjiyogenezin izlendiği organ kültürü çalışmaları da bulunmaktadır [11, 60].

Anjiyogenez; büyüme faktörlerini, ekstraselüler matriks moleküllerini, enzimleri ve hücre çeşitlerini içeren bir süreçtir ve *in vitro* ortamdaki çalışmalar bu sayılan tüm unsurları karşılayacak kadar geniş kapsamlı olamamaktadır (61). Endotel hücrelerin proliferasyon, göç etme gibi özellikleriyle ilgili çok sayıda *in vitro* çalışma olsa da; bunlar *in vivo* ortamda gerçekleşen kan damarı oluşumunu düzenleyen faktörleri tam anlamıyla taklit edemezler. 2-boyutlu kültür kaplarında yapılan yara iyileşmesi analizi, matrijelde kord veya tüp oluşumu analizleri gibi çalışmalarla izole pro-anjiyogenik faktörlerin etkisi, hücrelerin salgıladığı çözünebilir faktörlerin etkisi çalışılabilir. Ancak matrijel ticari bir ürün olması ve her ürünün birbirinden minimalde olsa farklılık göstermesi nedeniyle tekrarlanabilir doğru sonuçlar vermesi açısından deazavantaj taşır. Bunun yerine daha iyi tanımlanmış, laboratuvarda sentezi yapılan sentetik veya doğal biyomalzemelerin kullanılması kan damarı oluşumunda moleküler düzenleyicileri ve hücresel süreçleri daha iyi anlamamızı sağlar. Ayrıca biyometaryal kullanımına bağlı olarak oluşturulacak fiziksel çevre yapay ekstraselüler matriks yapısı oluşturur ve böylece *in vivo* ortama en yakın ortam taklit edilmiş olur. Ekstraselüler matriks yapının taklit edilmesinde en çok kollajen ve fibronektin gibi doğal birleşenler tercih edilir. Bu çalışmalarda anjiyogenik faktörlerin rolü spatio-temporal (mekânsal-zamansal) olarak ortaya konur. Ayrıca gelişen teknoloji sayesinde tasarlanan mikroakışkan kanal sistemleri ile bu anjiyogenik faktörlerin değişen gradiyentte etkinliği de araştırılabilir (61, 62).

Anjiyogenez çalışmalarında em çok tercih kullanılan in vivo modeller arasında tavşan kulağında oluşturulan çember modeli, tavuk embriyosu koryoallantoik membranı (CAM) ve kemirgen (fare) gözünün iris ve avasküler korneası ve retinası sayılabilir (63, 64, 65). Bunlar arasında tavuk koryoallantoik membranı ile çalışmanın başlıca avantajları düşük maliyetli olması, kolay ve güvenilir olması ve oldukça geniş bir membran alanında ilgili analizin yapılmasını sağlamasıdır (63). Bu sebeplerden ötürü CAM yapısı hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenez süreçlerinin çalışılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.3. Tavuk Embriyosu Gelişim Evreleri

1951 yılında Viktor Hamburger ve Howard Hamilton tarafından tavuk embriyosu için başka araltırmacılardan toplanan fotoğraf ve çizimlerin kombinasyonu ile 46 tane kornolojik gelişim evresi tanımlanmıştır.

Birinci evrede primitif çizgi gelişir; ancak embriyo net olarak ayırt edilemez.

İkinci evrede inkübasyonun altıncı-yedinci saatidir ve primitif çizgi görülür.

Üçüncü evrede inkübasyonun onikinci-onüçüncü saatidir ve primitif çizgi gelişimini sürdürür. Primitif oluk yoktur.

Dördüncü evrede primitif oluk, primitif çukur ve Hensen's nod görülebilir.

Beşinci evrede inkübasyonun yirminci saati civarıdır ve Hensen's nodu altında notokord görülmeye başlar. Baş gelişimi de bu evrede başlar; ancak somitler görülmez. Altıncı evre ile benzer özellikler görülür.

Yedinci evrede başın yanında nöral katlantılar oluşur ve somit çiftleri oluşmaya başlar.

Sekizinci evrede dört tane somit çifti vardır ve kan adacıkları oluşmaya başlar.

Dokuzuncu evrede yedi tane somit çifti vardır ve optik vezükül görülür.

Onuncu evrede on tane somit oluşur ve primer beyin vezikülleri oluşur.

11. evre 45. saattir ve arka beyin oluşumu görülür. Nöroporlar kapanmaya başlar.

12. evrede, 16 somit çifti vardır ve anteriyor nöropor kapanır. Baş gelişip sola döner ve primer optik vezikül ayırt edilir şekle gelir. Kalp S şeklini alır ve beyin katlantıları bir sonraki evreye kadar amniyon ile sarılır.

13. evrede 19 çift somit vardır ve baş tamamen sola döner ve telensefelon genişler ve ayırt edilir.

14. evrede 22 çift somit vardır ve somitleri bu evreden sonra ayırt etmek zorlaşır. Bu evre 50 saatlik inkübasyona karşılık gelir.

15. evre 55 saatlik bir inkübasyon sonrası zamandır ve gözün optik küresi oluşmuştur. Üçüncü brakial ark ve oluk tamamen oluşmuştur.

16. evre kanat ve kuyruk tomurcuklarının oluştuğu evredir ve inkbasyonun 51-56 saatlik kısmıdır. 64. saat sonrasında ise 17.evre görülür ve bu evrede aöniyon gelişimine devam ederek embriyo boyunca uzanır.

18. evre inkübasyonun 69. saati civarıdır. Allantois oluşmaya başlar. Bacak tomurcukları ve kanat tomurcuklarından büyük olarak görünür ve amniyon tarafından tamamen kaplanır.

19. evrede somitler kuyruğa kadar uzanır. Gözler renksizdir ve baş kuyruk kıvrılması görülür. İnkübasyonun 68-72. saatlerini kapsar. Allantois, 20. Evrede veziküler hale gelir. Ayrıca gözde soluk bir pigmentasyon başlar. Allantois genişlemeye ve başa doğru uzamaya başlar ve asimetrik olan uzuv tomurcukları 21. evrede yani inkübasyonun 72-84 saatinde, kanat tomurcuklarından belirgin şekilde daha büyük hale gelir.

22. evre inkübasyonun yaklaşık seksen dört saati sonunda göz pigmentasyonu ve kuyruğa tamamen uzanan somitleri olan bir embriyoyu tanımlar. 23. evre yaklaşık olarak inkübasyonun 96. saatidir ve uzuv tomurcukları genişleyerek uzar ve dördüncü cepte bir yarık meydana gelir.

24. evre dört buçuk gün kadar bir inkübasyonu ifade eder. Uzamaya başlayan uzuvlar ve parmak plakası oluşur. Bu evre sonrası beşinci güne kadar 25.evre gelir ve dirsek, diz, kanat plakası oluşumu görülür. 26. evrede yani inkübasyonun 5. Gününde embriyonun parmakları ayırt edilir.

27. evre beş-beş buçuk günler arasındadır ve ayak parmaklarında oyuklar belirir. 28. evrede embriyoda gaga yapısı görülebilir.

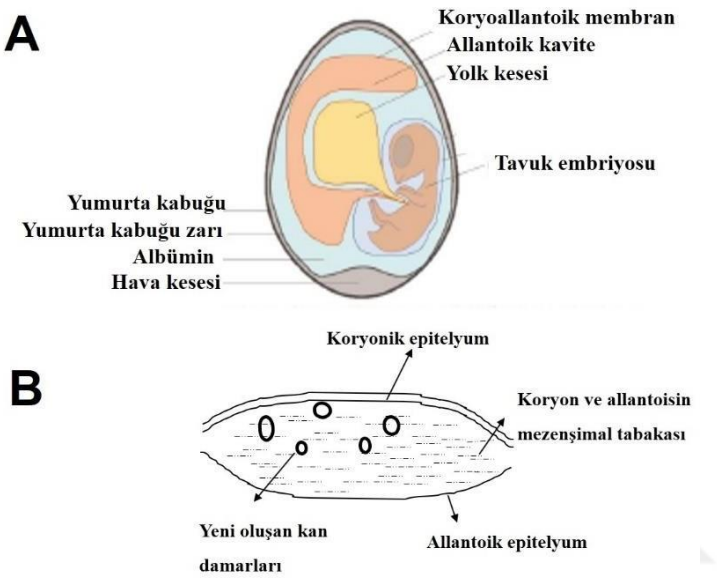
31-39. evrelerde tüy gelişimi görülür. 40.-45. evrelerde, gaga boyutunda ve ayak uzunluğunda artışı görülür. 46. evrede ya da 21. günde civciv yumurtadan çıkar (66).

2.3.1. Tavuk Koryoallantoik Membran Gelişimi

Tavuk koryoallantoik membran yüksek vaskülarize özellikte ekstraembriyonik bir membrandır. Vaskülarizasyonu en çok dikkat çeken özelliğidir. Yapısı nedeniyle biyomühendislik, gelişimsel biyoloji, morfoloji, biyokimya, transplant biyolojisi, kanser çalışmaaları ve farmakoloji alanı gibi oldukça geniş bir yelpazede deneysel model olarak kullanılmaktadır (13)

CAM, başlangıçta avaskülarize bir yapıdır ve tavuk embriyosu gelişiminin üçüncü günü civarı görülmeye başlanır ve kısa süre içinde vasküler ağ yapısını kazanır. Tavuk embriyosunun allantoyisi yumurta inkübasyonun ve embriyonik gelişimin üçüncü günü (E3) civarında ventral endodermal arka bağırsak duvarı boyunca uzanır. Embriyoyu ekstraembriyonik söloma doğru iter. E4 ve onuncu E10 gün arasında geçen

süreçte allantoyisin mezodermal tabakası (splanknik mezoderm) bitişiğinde bulunan koryonun mezoderm tabakası (somatik mezoderm) ile birleşir ve koryoallantoik membran oluşur (Şekil 2.4). Bu çift mezodermal tabaka kan damarları açısından oldukça zengindir ve embriyonik dolaşıma iki tane allantoik arter ve bir allantoik ven aracılığıyla bağlanır. Allantoik arter ve ven embriyonik dolaşımı sağlar. Bunlar memelilerde bulunan umbilikal arter ve ven ile analog yapılardır (12, 67, 68)**.**



Şekil 2. 4. Koryoallantoik membran yapısının gösterimi. A) Yumurta içerisinde CAM yerleşimi "12 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir" B) CAM yapısının çizimi.

Üç tipte CAM damarının varlığı öne sürülür. Bunlardan ilki membranda ağ yapısı oluşturacak şekilde düzenlenenler, ikincisi homojen dallanmalar göstererek membran boyunca ilerlemeler yapanlar ve üçüncüsü ise dallanan damarların kendi içlerinde düzenlenim göstermesiyle oluşanlarıdır. Bu damarların morfolojik olarak şekillenmesi CAM yüzey alanının büyümesiyle ilişkilendirilmektedir. E6 ve E14 arasında yüzey alanında olan artışın besleyici damarları arttırdığı gösterilmiş iken; E10 sonunda baskın olan durumun damar büyümesi ve yeniden modellenmesi olduğu gösterilmiştir (67, 69, 70).

CAM vaskülarizasyonu gelişimsel süreçte üç fazda incelenir. İlk fazda çok sayıda kapiller mezenşimi işgal eder ve burada mezenşim ile kaynaşıp primer kapiller pleksusu oluşturur. İkinci faz, filizlenme olmadan yani endotel hücrenin mitotik

aktivitesi olmadan damarın sütunlar oluşturarak intususeptif anjiyogenezle büyümesidir ve üçüncü faz geç faz olarak da bilinir ve büyüyen sütunlar arasındaki ilişkinin kurulması ile interkapiller ağın oluşmasıdır (67, 71). Bu belirtilen evreler ve morfolojik değişimler CAM yapısının kullanılacağı deneysel modeli de belirlemektedir. Örneğin tümör anjiyogenezi ile ilgili deneysel modelde CAM gelişimin 4. gün civarı tercih edilir. Böylece endotel hücrelerin mitotik aktivitesi ile oluşan damarlardan beslenen tümör dokusunun gelişimi yorumlanabilir.

Dördüncü günde CAM damarları farklanmamış kapiller görüntüsündedir. Bu damarların duvarı tek katlı endotel hücre içerir ve bazal lamina oldukça incedir. Sekizinci günde CAM küçük, ince duvarlı ve koryonik epitelyuma bitişik damarları içerir. Mezodermal tabakadaki diğer damarlar mezenkimal hücrelerle sarılı ve bazal laminası belirginleşen endotel tabakasıyla görülür. E10-E12 arasında kapiller koryonik epitelin yüzeyindedir. Mezodermal damarlar olan arteriyollerin duvarı bir veya iki tabakalı mezenkimal hücre içerir ve etraftaki bağ dokusu daha kalındır ve venüller daha az mezenkimal hücre içeren tabakları ile birbirlerinden ayırt edilir (67). Tavuk embriyosunun sekizinci gününe kadar primitif damarlar prolifere olur ve bunlar arteriovenöz sisteme farklanarak kapiller ağı oluşturur. Bu ağ yapısının koryon ile tamamen birleşmesi ile CAM artık embriyonun gaz değişimini sağlayan yapı halini alır. CAM yapısındaki vasküler ağ büyümesi O_2 difüzyon kapasitesini sigmoid olarak attırır ve yapının gelişimi embriyonun O_2 alım ihtiyacına paralel olarak ilerler. CAM damarları E11'e kadar hızla büyür ve sonrasında mitotik indeks hızla düşer ve vasküler sistem gelişimin 18. gününde son halini alır. Ekzojen bir faktör uygulaması olmadığı takdirde endotel hücre mitotik indeksi düşmeye devam eder ve damarlanma daha çok intususeptif anjiyogenez ile ilerler (68, 72). Koryonik epitel ve mezodermal damarlar arasındaki bölge anjiyogenezin ilerlediği alanlardır ve fibronektin, laminin, kollajen tip IV ve glikozaminoglikanların ektraselüler matriksteki dağılımı bu süreçte önemlidir. Fibronektin, gelişimin erken evrelerinde koryona bitişik olarak ekstraselüler matrikste bulunur ve bu zamanlarda henüz epitel altında kapiller pleksus oluşmamıştır. Fibronektinin buradaki varlığı mezodermal kan damarlarından filizlenerek birleşen endotel hücrelerinin göçünü teşvik etmektedir. Ayrıca fibronektinin fazla miktarda ifadelendiği zaman aralıkları CAM üzerinde vazoproliferasyonun arttığı zaman aralıklarına denk gelmektedir. Laminin CAM gelişiminin bütün evrelerinde ifadelenmektedir ve bu durum subendotelyal bazal membran farklanmasında lamininin erken evre ve geç evre olmak üzere tüm süreçteki

etkinliğini gösterir. Tip IV kollajen, CAM vasküler gelişiminin geç aşamalarında, endotel hücrelerinin terminal farklılaşması ve bazal membranın olgunlaşması ile birlikte görülür. Bu durum, giderek daha yavaş mikrovasküler endotel hücre proliferasyonuna ve lümen oluşumuna sebep olur, endotelyal göçte kademeli olarak azalır, hücre polaritesi tamamen oluşur ve farklanmış endotelyal fenotipi tamamen kazanılır. Glikozaminoglikan çeşitlerinden biri olan hyalorunik asit CAM üzerinde kapiller pleksus oluşumu, sıralanması ve göç etmesinde rol oynarken; heparan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat arteriyol ve venöz damarların CAM üzerinde farklanması ve gelişiminde rol oynar (70).

Arteriyol endotelyumda E9-E13 günleri arasında görülen sıkı bağlantılar artış gösterir ve periendotel alanda kollajen lifler ve hücre hacmi yoğunluğu artar. Bu hücrelerin çoğunun muhtemelen düz kas hücresi olduğu öne sürülür. Arteriyollerin tersine, bu evrede venüller ve kapillerde endotel yanyana yayılım göstermez ve noktasal görüntü sergiler. Kapillerin periendotel alanında değişim yoktur. Geç evreler olan E14-E18 arasında arteriyol endotelyumu etrafında sirküler yapılanma gösteren düz kasların çok sayıda tabakası görülür. Endotelyumun kalınlığı hem arteriyol hem de venüllerde artış gösterir ve arteriyollerde endotel karışık, iç içe geçmiş bir yapı sergiler. Bu evrede bütün CAM damarlarının bazal lamina kalınlığı artış gösterir. Bu gözlemler mikrovaküler sistemin gelişimini orataya koymak adına önemlidir (73).

Bu bilgiler vaskülarize CAM yapısının damar morfolojsinin izlenmesi ile ortaya konmuştur. CAM vaskülarizasyonunun moleküler boyutuna bakıldığında yine VEGF ve bFGF eşliğinde ilerleyen bir süreç görülmektedir. Bu iki faktör başta olmak üzere HIF-1α, TGF-β1 gibi faktörlerin de CAM yapısında vaskülogenezi ve anjiyogenezi düzenlediği bilinmektedir (74).

VEGF-A ifadelenmesinin incelendiği bir çalışmada E8, E10 ve E12'de ifadelenmenin pik yaptığı ve E12 sonrasında bu değerde azalma olduğu gösterilmiştir. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda VEGF-A için sinyal E7, E8 ve E14'de azken; E9, E10 ve E11'de fazlalaşmıştır ve E12 ve E13'de en fazla boyanma görülmüştür. Ayrıca, VEGF-A için inhibitör kullanılarak faktörün hangi tip damarlanmada daha baskın etkisi olduğu gösterilmek istenmiştir ve sonuç olarak E10 ve E12 günleri karşılaştırıldığında intususeptif vasküler pleksus ağ oluşumunda gerileme görülmüştür (14).

Vaskülarizasyon gerçekleşirken CAM yapısında gelişimsel süreçte bFGF ifadesinin de arttığı gösterilmiştir. Fibroblast büyüme faktörünün incelendiği bir

çalışmada, E6-E18 arasında artan miktarda ve E10-E14 arasında maksimum değerde CAM dokusunda ifadelendiği bulunmuştur. Ekzojen olarak insan rekombinant bFGF uygulamasının vaskülarizasyou arttırdığı ve bununla uyumlu olarak nötralize edici antikor bFGF'ye karşı uygulandığında vaskülogenezin azaldığı gösterilmiştir (75).

Anjiyogenik faktörlerin gelişimsel süreçte birbirleriyle ilişkisini göstermek amacıyla VEGF-A, FGF-2, anjioyopoietin-1 (ANG-1), HIF-1α ve HIF-2 α, hepastosit büyüme faktörü (HGF) ve endostatin ile yapılan bir çalışmanın sonucunda anjiyogenik faktörlerin beyin, kalp, karaciğer dokularında gelişimin tüm evrelerinde ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca endostatin bir anti-anjiyogenik faktör olduğu için bu ifadelenmelerin endostatin ifadesine bağlı olarak düzenlendiği gösterilmiştir. CAM yapısına bakıldığında ise Ang-1 hariç tüm anjiyogenik faktörlerin gelişimin ilerleyen evrelerinde düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Bu durum, ekstraembriyonik yapı olan CAM ile embriyonun iç organlarının farklı kan damarı oluşumuna ve yapısına sahip olduğunu göstermektedir (74).

Yapılan çalışmalar ve CAM yapısının gelişimi, fonksiyonu göz önüne alındığında, hem vaskülogenez hem de anjiyogenez süreçleri için birden fazla faktörün birbirleriyle ilişkisinin ortaya konarak yapıldığı çalışmaların çok daha aydınlatıcı olacağı görülmektedir.

2.3.2. Koryoallantoyik Membran ve Anjiyogenez Çalışmaları

1970'li yıllardan itibaren CAM anjyiogenez çalışmaları için kullanılmaktadır. Bu çalışmalarla günümüze kadar incelenenler: vaskülogenez/anjiyogenez süreçlerinin değerlendirilmesi, tümör greftleriyle tümör dokusunun büyümesinin değerlendirilmesi, biyomateryallerin uyumluluk kontrolü, yeni potansiyel ilaçların değerlendirilmesi ve kimyasalların toksisite testleri, endotel öncü hücresi ve mezenkimal kök hücresi ve mezenkimal kök hücre kökenli mikroveziküllerle anjiyogenezin değerlendirilmasi şeklindedir (12).

Vasküler yoğunluğun CAM üzerinde ölçülmesini sağlayan teknikler: implante edilmiş kollajen içerikli veya aljinat, jelatin, metilselüloz jellere dikey olarak büyüyen damarların sayılması, damar çapı ve uzunluğunun morfometrik analizi, damar yoğunluğunun mikroskobik yöntemlerle ölçülmesi, dallanma noktalarının tespit edilmesi, kapiller uzunluk, çap ve yoğunluk tayininin elektron mikroskop ile yapılması ve histolojik kesitlerde kapillerin sayının belirlenmesidir.

Yumurtanın kültür edilme şekline göre CAM protokolleri *in ovo* veya *ex ovo* olarak iki şekilde yapılır.Yumurtalar *in ovo* teknikte inkübasyona konmadan 72. Saat boyunca rotatorda döndürülmeye başlar. Sonrasında inkübasyona alınan yumurtaların kabuğunda CAM görünecek şeklinde bir pencere açılır ve bu işlem ile CAM yumurta kabuğuna bağlanmadan gelişimini devam ettirir. Bu işlemde CAM yüzeyine herhangi bir kabuk materyali düşmemesi önemlidir. Aksi takdirde doğal vasküler gelişim bozulacaktır. Yumurta kabuğunun ekstraembriyonik membranlara zarar verilmeden kırılıp embriyonun dışarıda uygun bir petri ve kültür koşullarında gelişiminin sağlanması ise *ex ovo* tekniktir. Bu teknikte CAM yüzeysel olarak gelişmektedir. Yumurtanın kırılması için en uygun zaman ise 72. saat civarıdır. Kontaminasyon her iki sistem için sorun olsa da; ex ovo kültürler hem dış faktörlere daha çok maruz kalırlar hem de maruziyet alanı bu kültürde daha fazladır ve bu yüzden kontaminasyon ihtimali daha fazladır. Kontaminasyon sadece embriyonun sağkalımını etkilemez, aynı zamanda yanlış anjiyogenik cevabın oluşmasını da sağlar. Öte yandan, İki deney sisteminin karşılaştırıldığı çalışmalarda embriyonun gelişimin ilk 15 gününde kondrogenez, osteogenez ve sinir myelinizasyonu arasında fark görülememiştir (12, 68).

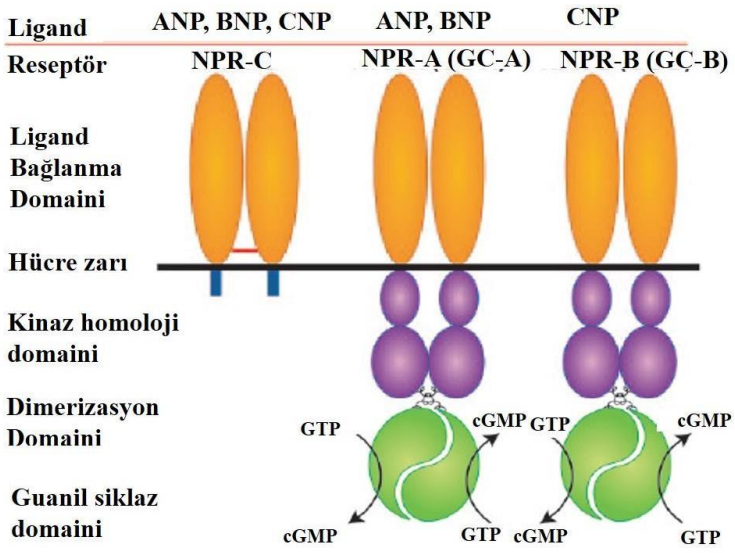
CAM yapısı; ucuz, erişilebilir, üretilebilir, tekrarlanabilir ve güvenilirli olması nedeniyle tercih edilebilir; ancak bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi vaskülogenez yapısının yeni oluşan bir durum mu yoksa CAM yapısının önceden olan vaskülogenezinden kaynaklı bir durum mu olduğunun ayırt edilmesidir. CAM halihazırda vaskülarize bir yapıdır ve üzerine implante edilen tümör dokusunun veya biyometaryal yapısının vaskülogenezini bu önceden olan vaskülogenezden ayırt etmek gerekir (76). Dolayısıyla, anjiyogenezin deneysel çalışmasının öncesinden mi sonrasından mı olduğunun anlaşılması için varolan damarların tayin edilmesi gereklidir. Bunun için negatif ve pozitif kontrollü çalışmalar sürdürülmesi faydalıdır. Ayrıca oluşan anjiyogenezin infalamatuvar yanıt olarak oluşup oluşmadığının ayırt edilmesi de önemlidir. CAM yapısı gelişiminin 12. gününe kadar immün yanıt geliştirmez ve bu durum özellikle yabancı materyallerin impalantasyonunda immün yanıt oluşmaması ve çalışmanın sürdürülmesi açısından değerlidir.

2.4. Natriüretik Peptidler ve Reseptörleri

Natriüretik peptidler (NP), kardiyorenal eksenin merkezinde fizyolojik öneme sahip peptidlerdir. Kardiyorenal homeostazın genel düzenlemesine ve kan basıncı regülasyonuna katkıda bulunurlar (77). NP'lerin reseptörleri ve ikinci habercileriyle birlikte tamamladıkları büyük resme bakıldığında, osteoporoz ve böbrek hastalıkları ile önerilen ilişkileri başta olmak üzere kıkırdak, kondrosit, osteosit, osteoklast ve endotel hücrelerindeki ifadelenmeleri de dikkat çekicidir (78, 79).

1981 yılında De Bold ve arkadaşları ilk kez natriüretik peptidlerin etkisini ortaya koyan bir çalışma yapmışlardır (80). Bu çalışmada sıçan kalbi atrial ekstraktı alınarak intravenöz enjeksiyon ile sıçanın dolaşımına verildiğinde kan basıncının hızla düştüğü ve buna böbrekten sodyum ve su atılımının eşlik ettiği bulunmuştur. Ancak aynı çalışma ventrikül eksraktı ile yapıldığında elde edilen bu etkilerden hiçbiri gözlenmemiştir. Bu çığır açıcı çalışma sonrasında birçok grup hem natriüretik aktiviteye sahip hem de düz kas gevşetici özelliğe sahip farklı boyutlardaki peptidleri atrial dokulardan izole etmiştir. Bu peptidlere atrial natriüretik faktör, kardiyonatrin, kardiyodilatin, atriopeptin ve atrial natriüretik peptid gibi bir dizi farklı isim verilmiştir (81). Günümüzde atrial natriüretik peptid (ANP) en sık kullanılan isimdir. Sonrasında 1988 yılında B tipi natriüretik peptid (BNP) ve 1990 yılında CNP domuz beyni dokusundan düz kas gevşetici fonksiyonları temel alınarak saflaştırılmıştır. ANP, hücrelerde granüller şeklinde depolanırken; BNP sentezlendiğinde hücre dışına salınmaktadır. CNP üç peptid arasında dolaşımda en az seviyede bulunur. Dendroaspis natriüretik peptid ise natriüretik peptid ailesinin son bulunan üyesidir. Dendroaspis augusticeps türü bir yılandan 1992 yılında izole edilmiştir. Bu peptid ANP ile yarışmalı olarak onun reseptörüne bağlanır ve kardiyak kasında gevşemeye sebep olur (78).

Natriüretik peptidler için bilinen üç tip reseptör bulunmaktadır. Bunlar natriüretik peptid reseptörü A (NPR-A, GC-A, NPR1), natriüretik peptid reseptörü B (NPR-B, GC-B, NPR2) ve natriüretik peptid reseptörü C (NPR-C, NPR3)'dir. NPR-A ve NPR-B insanlarda bulunan beş tane transmembran guanil siklazdan ikisidir. Üçüncü natriüretik peptid reseptörü olan NPR-C ise bilinen herhangi bir hücre içi enzimatik aktiviteye sahip değildir ve aktivitesini üç tane peptid molekülünün lokal konsantrasyonunu ayarlayarak gösterir (Şekil 2.5) (81).



Şekil 2. 5. Natriüretik peptidler ve reseptörlerinin gösterimi "81 nolu kaynaktan alınmış ve Türkçeye çevrilmiştir"

ANP ve BNP etkisini NPR-A reseptörü aracılığıyla gösterirken; CNP etkinliğini NPR-B reseptörü aracılığıyla gösterir. Her iki reseptör tipi guanil siklaz ile ilişkilidir ve hücre içinde guanil siklaz sinyal yolağını altive ederek faaliyet gösterirler. NPR-A için peptid ligand afinitesi ANP≥BNP≥CNP iken; NPR-B için peptid ligandı afinitesi CNP≥ANP=BNP'dir (82). NPR-C içinse ANP > CNP > BNP şeklinde bir afinite söz konusudur. NPR-A, ANP ve BNP için sepesifik reseptör iken; NPR-B CNP için spesifik denebilir (83).

NPR-C üç tane peptid molekülüne benzer afinite ile bağlanır ve çok çeşitli hücrelerin yüzeyinde yoğun olarak bulunur. Esas işlevi, natriüretik peptidleri reseptör aracılı internalizasyon ve degredasyon yoluyla dolaşımdan çıkarmak çıkarmaktır. Böylece, NPR-A ve NPR-B'ye bağlanmak için mevcut olan natriüretik peptidlerin lokal konsantrasyonlarını kontrol eder. NPR-C klerans işlevine ek olarak hücre içinde G-protein eşlikli sinyal yollarını da aktive eder (17, 82). Ayrıca, son yıllarda NPR-C'nin CNP ile olan etkileşimi sonucunda vasküler yeniden modellenme süreçleriyle ilişkisi olabileceği gösterilmiştir (17).

Bütün natriüretik peptidler preprohormon olarak sentezlenir. Proteolitik reaksiyonlar sonucunda propeptid haline gelirler ve sonrasında transmembran serin protezlar ile amino ve karboksil uçlarında düzenlemeler yapılarak aktif peptid haline dönüşürler (82). Natriüretik peptid ailesinin üç üyesi olan ANP, BNP ve CNP ortak korunmuş CFGXXXDRIXXXXGLGC sekansını içerir. Her bir kıvrılma noktasında

bulunan sistein aminoasitleri peptid üzerinde disülfit bağlarının kurulması ve biyolojik akitivitenin gerçekleşmesi için gereklidir (81).

Prepro-ANP 151 aminoasit içeren öncüldür ve 25 aminoasitlik sinyal sekansı içerir. Bu sinyal peptidin sentez sırasında uzaklaştırılması ile pro-ANP oluşur. Bu peptid 126 aminoasitlik sekans içerir ve atrial kardiyomiyositlerde membran-bağlı granüller şeklinde depolanır. ANP esas olarak, atrial hücre granüllerde depolanır ve eksprese edilir, ancak düşük konsantrasyonda ventrikul ve bobrek gibi dokularda bulunduğu gösterilmiştir. Kan basıncını yükselmesi gibi uygun uyaran varlığında, bu memran-bağlı granüller hücre yüzeyine doğru hareket eder ve depolanmış pro-ANP'yi serbest bırakır ve bu korin veya bir transmembran kardiyak serin proteaz olan pro-hormon dönüştürücü PCI / 3 tarafından klivaje edildikten sonra N terminal ANP 1-98 ve biyolojik olarak aktif ANP-28 üretilir. ANP-28 ANP olarak da bilinen aktif peptid formdur. Bu form insanda dolaşımda bulunan ana formdur ve türler arasında yüksek düzeyde korunmuştur (78).

ANP'nin sıçan dokularında, primer hücre kültürü ve idrarda siklik guanozin monofosfat (cGMP) konsantrasyonlarını yükselttiği gösterilmiştir. Ayrıca yine çeşitli sıçan dokularında ANP'nin düz kas gevşemesiyle orantılı olarak guanil siklaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (81). ANP, ekstraselüler proteazlar ve NPR-C aracılı olarak internalizasyon ve degradasyon bağımlı şekilde yıkılır. Nötral endopeptidaz (NEP) ve insülin yıkıcı enzimin de ANP'yi yıktığı gösterilmiştir (82).

BNP'nin 134 tane aminoasit içeren şekli prepro BNP olarak isimlendirilir. 26 aminoasitlik sinyal peptid kesilince pro-BNP veya BNP1-108 meydana gelir. Bu molekül de furin tarafından BNP 32 ve N-terminal BNP (NT-BNP) şekline getirilir. NT-BNP, kan konsantrasyonları miyokardiyal hormonal sekresyon oranını etkilemeyen pro-BNP'nin inaktif bir metabolitidir. ANP'nin aksine BNP türler arasında geniş bir varyasyon gösterir. BNP mRNA molekülü ve peptidi atrial miyositlerde detaylı şekilde tanımlanmıştır. BNP biyolojik olarak aktif bir hormondur ve hassas şekilde endokrin kontrolü ile sıkı şekilde düzenlenir. Normal kişilerde plazma BNP seviyeleri 0.6 pmol / L ila 9.8 pmol / L arasında değişir (bunlar eşzamanlı ANP seviyelerinden daha düşüktür) (78).

CNP, esas olarak vasküler endotelyumda ve merkezi sinir sisteminde bulunur. Merkezi sinir sistemindeki en yaygın natriüretik peptidtir. Prepro CNP 126 aminoasitlik bir peptid moleküldür ve 103 aminoasitlik polipeptid ve pro-CNP olarak ayrılır. Pro-CNP furin ile işlenince biyolojik aktif olan CNP-22 oluşur ve daha büyük

olan inaktif CNP-53 oluşur. CNP, plazmada baskın olarak CNP-53 şeklinde bulunur. CNP-22 ise CNP'nin kendisini ifade etmektedir ve diğer matriüretik peptidlerden farklı olarak karboksi-terminal uzantısı içermez (78). CNP ilk olarak beyinde görüldüğü için, başlangıçta bir nöropeptid olarak kabul edildi; ancak daha sonra yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyonlarda da olsa böbreklerde, kemiklerde, kanda, damarlarda ve cinsel organlarda tespit edildi. CNP mRNA'sının varlığı kalpte atrium ve ventriküllerde gösterilmiştir; ancak ANP ve BNP'den farklı olarak, CNP kardiyomiyositlerde değil fibroblastlarda bulunur. CNP, kardiyak peptidler gibi hücrelerdeki salgı granüllerinde depolanmaz, bu nedenle sentezinin ve salgılanmasının düzenlenmesi, ekzositozdan ziyade CNP transkripsiyonun aktivasyonu / inhibisyonu yoluyla düzenlenir. Yaygın bir görüş olarak CNP belirgin vazodilatör ve antimitojenik (antiproliferatif) etkilere sahip bir oto- veya parakrin hormon olarak da kabul etmektedir (84). Ayrıca endotel kökenli CNP'nin vasküler homeostazis üzerinde etkisi büyüktür. Lokal kan akışını ve sistemik kan basıncını kontrol eder, lökosit ve platelet reaksiyonunu azaltır ve anevrizma gelişimini önler. CNP biyolojisi ile ilgili bulgular bu peptidin anjiyogenezde de merkez rol üstlendiğini işaret etmektedir (17).

2.4.1. C-Tipi Natriüretik Peptid ve Vasküler Yapılar ile İlişkisi

Vasküler biyoloji düzenleyicileri söz konusu olduğunda, natriüretik peptidler, tuz ve su dengesinin yanı sıra vasküler tonusu düzenleyen küçük protein ailesi üyeleri olarak ön plana çıkar. ANP ve BNP baskın olarak kalpte bulunmasına rağmen; CNP endotel hücrelerinde baskın olarak bulunur. Hem dolaşımdaki hem de lokal olarak üretilen natriüretik peptidlerin vasküler tonusu ayarlamanın yanısıra vasküler hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu peptidlerin reseptörleri ile etkileşimi cGMP üretimini uyarır ve sonrasında da protein kinaz G (PKG) aktive edilerek hedef genlerin ifadelenmesi veya iyon kanallarının düzenlenmesi sağlanır. Ancak bir diğer etki mekanizmasında ise natriüretik peptidlerin NPR-C etkileşiminin rolü olduğu ve bunun cGMP bağımsız olduğu düşünülmektedir.

CNP vasküler ağ boyunca ve özellikle endotelyumda yüksek düzeyde ifadelenir. CNP, NPR-B üzerinden cGMP aracılı damar düz kas gevşemesini sağlarken (85, 86); NPR-C aracılı olarak ise endotel kökenli hiperpolarize edici faktörün (EDHF) parakrin etkili olan nitrik oksit ve prostosiklin ile beraber salınmasını uyarır. Dolayısıyla endokondral kemikleşmede, merkezi sinir sisteminde, üreme sisteminde görevleri olan

CNP, NPR-C ile ligand-reseptör etkileşimi kurarak kardiyovasküler fonksiyonların sürdürülmesinde de görev alır (85).

Yapılan bir çalışmada, natriüretik peptidlerin (c-ANP$_{4-23,}$ NPR-C ligandı) VEGF transkripsiyonunu ve protein üretimini insan vasküler hücre kültürü ortamında inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyonun normalde VEGF varlığında hem endotel hücre proliferasyonu hem de anjiyogenezde etkili olan MAPK ve Janus kinaz (JNK) sinyal yolu kaynaklı olabileceği gösterilmiştir (87). Bu bulgular doğrultusunda, CNP'nin VEGF için hem endotel hücre proliferasyonunda hem de anjiyogenezde tanımlanan endojen bir inhibitör olabileceği düşünülebilir.

NPR-C agonisti olan C-ANP-$_{4-23}$'ün polieter poliüretan süngerler ile fare sırtına implante edilmesi ile yapılan çalışmada fibrovasküler dokunun anjiyogenezi değerlendirilmiştir. Sonuçta, kullanılan CNP agonistinin VEGF ile uyarılan anjiyogenik adımlar olan endotel hücre proliferasonunu, migrasyonunu inhibe ettiği ve VEGF üretimini de inhibe ettiği bulunmuştur (88)**.**

CNP, biyolojik etkisini NPR-C ve NPR-B aracılı olarak gösterir. Bu iki reseptör tipi endotel hücrelerde yoğun olarak ifadelenir ve NPR-C endotel hücrelerde natriüretik peptid reseptörelerinin %95 kadarını oluşturur. CNP endotel ve düz kas hücresi proliferasyonu üzerinde de etkilidir. Doku iyileşmesi ve vasküler onarım sırasında endotel hücre proliferasyonunu uyarırken beraberinde düz kas proliferasyonunu inhibe eder (89). Karotid hasarı oluşturulan bir çalışmada CNP muamelesi sonrasında NPR-B ile kurulan ligand-reseptör ilişkisi ile cGMP artışı gösterilmiştir. Ayrıca CNP'nin bu etkisi cGMP bağımsız olarak NPR-C aracılı olarak da gösterilmiştir (90). CNP'nin doz bağımlı etki ile (1 pM-1 μM) ile ERK1/2 aktivasyonu ve endotel hücrelerde hücre döngüsü proteini olan siklin D1 promotorunun artan ifadelenmesi ve düz kas hücrelerinde hücre döngüsünün negatif düzenleyicileri olan p21 ve p27 artan ifadesi görülmüştür (89). Bu bulgu, insan umbilikal kord veni endotel hücreleri ve sıçan aortik düz kas hücreleri ile yapılan bir çalışmayla desteklenmiştir. NPR-C *knock-out* hücrelerde yabanıl tip hücrelere göre endotel hücreler daha yavaş proliferasyon gösterirken; düz kas hücrelerinde proliferasyon artmıştır (91). Bu çalışmalar, CNP'nin NPR-B yanısıra NPR-C ile vasküler sistem üzerindeki etkisini cGMP bağımsız farklı bir yol kullanarak gösterdiğini desteklemektedir**.**

CNP'nin *in vitro* tüp oluşumu analizinde kapiller ağ oluşumuna VEGF etkisine benzer şekilde etki ettiği gösterilmiştir. Buna ek olarak, CNP gen transferinin yapıldığı

sıçan femoral arter iskemisi modelinde kan akımının yeniden kurulduğu, hızlandığı ve kapiller yoğunluğun arttığı bulunmuştur. CNP'nin oluşturduğu bu anjiyogenik etkilerin yukarıda da belirtildiği üzere ERK1/2 yolağı ile bağlantılı olabileceği ileri sürülmektedir (89). Başka bir çalışmada (92), CNP'nin endotelyal hücreler üzerindeki göç etkisinin, anjiyogenezde potasyum kanallarının ATP aracılı aktivasyonu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Çalışmada, ölümsüzleştirilmiş fare beyin mikrovasküler endotel hücre hattı (BEnd.3) ve insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECs) kullanılarak potasyum kanalları aracılığıyla CNP ve VEGF'in etkileri analiz edilmiştir. Sonuçlar, potasyum kanal aktivatörleri, CNP ve VEGF kullanımının anjiyogenezde benzer sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ek olarak, aynı sonuçlar CAM analizi ile gösterilmiş ve potasyum kanal inhibitörleri kullanıldığında, CNP aracılı anjiyogenezin CAM yapısında bozulduğu gösterilmiştir. Ayrıca, CNP'nin bu etkisine NPR-C'nin aracılık ettiği düşünülmüştür (92).

Anjiyogenez düzenlenmesinde CNP ve VEGF arasında karşılıklı bir ilişkinin varlığı dikkat çekicidir. VEGF'in endotel hücrelerde CNP salınımını engellediği ve CNP'nin de VEGF üzerinde aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir; ancak bu iki molekül arasındaki ilişkide bağı kuran bir mekanizmın varlığı henüz gösterilememesine rağmen; CNP'nin VEGF bağımsız bir yol ile anjiyogenezde etkisi olduğu belirtilmektedir (17).

Endotel hücrelerden CNP salgılanmasının bFGF etkisiyle arttığı gösterilmiştir. Ancak, bFGF inkübasyonunun aort ve beyin vasküler düz kas hücrelerinde CNP mRNA ifadesini azalttığı da gösterilmiştir. Ayrıca, aort düz kas hücrelerinde bFGF etkisinde TGF-β aracılı uyarımın CNP üretimini ve salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir (93). bFGF ve CNP ilişkisinde de VEGF ile ilgili olan çalışmalarda olduğu gibi aydınlatılmayı bekleyen noktalar vardır.

2.4.2. İnsan CNP ve Tavuk CNP-3 Homolojisi

Sunulan tez çalışmasında, CNP'nin tavuktaki homoloğu olan CNP-3 molekülü çalışılmıştır. C-tipi natriüretik peptid, 2q24-qter bir kromozomal lokasyona sahip tek bir gen olan natriüretik peptid öncüsü C'nin (Nppc) ürünüdür (81, 94). Houweling ve ark. (95), tavuk natriüretik peptid öncü gen kümesini tanımlayarak karakterize etmiş ve bu genin organizasyonunun, memeli Nppb-Nppa kümesiyle karşılaştırıldığında yüksek oranda korunmuş olduğunu bulmuştur . Buna ek olarak, tavuk CNP-3, insan

CNP'sinin amino asit dizisiyle yüksek homoloji göstermektedir (95, 96). Dolayısıyla tavuk embriyosu CAM modelinin kullandığı bu çalışmada, önceki çalışmalarımızda da (96, 96) kullanılmış olan CNP-3/NPR-B dizilerinin revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz yöntemi seçilmiştir.

Yapılan çalışmalarda CNP ve anjiyogenez ile ilgili faktörlerin arasındaki ilişkinin doku onarımı ve vasküler yeniden modellenme üzerine yoğunlaştığı görülür. Gelişimsel süreçte bu moleküllerin arasındaki ilişkiye yönelik çalışmaların yapılması da gereklidir. Buna bağlı olarak önerilen tez çalışmasında gelişimsel süreç için model olarak seçilen tavuk embriyosu CAM yapısı kullanılarak insan CNP molekülü ile yüksek oranda homoloji gösteren CNP-3 ve VEGF ve bFGF ve reseptörleri arasındaki ilişkinin yedinci ve yirminci günler arasında incelenmesi ve faktörler arasındaki ilişkinin moleküler ve histolojik olarak ortaya konması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından 20/14 sayılı karar (Proje no: DA20/14) ile bu tez çalışmasının etik kurallara uygun olduğu onaylanmıştır.

3.2. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi

Planlanan bu tez çalışmasında kullanılacak yöntem için uygun doku, boyut ve anatomiye sahip, filogenetik bakımdan en düşük olan grubun tavuk embriyoları olması sebebiyle çalışmada döllenmiş tavuk yumurtası kullanılmıştır.

3.3. Tavuk Embriyosu CAM Doku Örneklerinin Toplanması

Çalışmada kullanılacak döllü tavuk yumurtaları (ATAK-S cinsi, döllü yumurtalar, dişi ve erkek) T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tavukçuluk Araştırma Enstitüsünden alınmıştır.

Döllenmiş yumurtaların dış kabukları %70 alkol ile silinip temizlenmiştir. Ardında yumurtalar, VGS marka kuluçka makinesi içerisine kuluçka koşulları sıcaklık 37,75 ^{o}C ve nemli ortamını koruyacak şekilde hazırlanarak konmuştur. Yumurtaların üzerine kuluçkaya kondukları tarih kurşun kalemle yazılmıştır ve bu sayede her bir yumurtanın gelişmenin hangi gününde olduğu takip edilmiştir. Çalışmamızda döllenmemiş yumurta oranının (%10) yaratacağı eksiklik göz önüne alınarak kullanılacak yumurta sayısı 90 adet olarak belirlenmiştir. Her bir analiz için gün aşırı olacak şekilde ayrı ayrı yumurtalardan örnekler toplanmıştır.

Gelişimin yedinci gününden itibaren yirminci gününe kadar CAM doku örneklerinin toplanmasına başlanmıştır. Bunun için yumurta kabuğuna sivri olmayan tarafından pencere açılarak ve sonrasında bu açılan pencere steril cerrahi aletler ile büyütülerek embriyonun kendisinin dışarı çıkması; ancak CAM dokusunun kabuk altında kalması sağlanmıştır. Sonrasında kabuk altından CAM doku örneği alınarak yapılacak analiz tipine göre uygun solüsyon içerisine alınmıştır. Ayrıca 0.4mg/ml konsantrasyonunda sodyum pentobarbital anestezik intrasölomik olarak 13 günden

büyük olan yumurtalarda uygulanmıştır. Işık mikroskop ve elektron mikroskop ve RT-PCR analizlerinin her biri için ayrı ayrı olmak üzere gün aşırı üç yumurta kullanılması yeterli olmuştur. Buna göre toplamda %10 yumurta kaybı da göz önüne alınarak çalışmamız için toplam 90 tane döllü yumurta kullanılmıştır.

Histokimyasal değerlendirmeler ışık mikroskop ile hematoksilen&eozin boyama, toluidin mavisi ve elektron mikroskop incelemesi olarak yapılmıştır.

3.4. Işık Mikroskop İncelemesi İçin Kullanılan Çözeltilerin/Boyaların Hazırlanışı

3.4.1. %10 Formol Fiksatifi (Tamponlu) Hazırlanması

Kimyasal Adı	**Miktar**
37-40% stok formalin solüsyonu	100 ml
NaH_2PO_4 (monobazik)	4g/L
Na_2HPO_4 (dibazik/anhidröz)	6.5g/L

900 ml distile su ile pH değeri 6.8 olacak şekilde solüsyon hazırlanmıştır.

3.5. CAM Doku Örneklerinin Işık Mikroskop İle Değerlendirilmesi

Işık mikroskobu için alınan örnekler hematoksilen&eozin boyama için %10 formol ile fikse edilmiş ve parafin bloklar içerisine gömülmüştür. Bu işlem için ilk olarak dokular 24 saat oda ısısında fiksatif içinde bekledikten sonra yıkama adımı olmaksınızı direkt %75 alkol içerisine alınmıştır ve gece boyu %74 alkol içerisinde dokular beklemiştir ve ertesi gün alkol yenilenerek tekrar 1 saat %75'lik alkole alınmıştır, sonrasında %96'lık alkolde 1.5 saat bekletilen dokular ardından şeffaflaştırma basamağı için ksilen içersine alınmıştır ve beş dakika ksilen ile yılama sonrası iki, üç saat arasın dokular 65 ^{0}C etüvde parafinde tutulmuştur. Sonrasında metal gömme kapları ve kasetler kullanılarak toplu iğnelerle membran yapısı sabitlenerek parafin bloklar içersine gömülmüştür.

Hazırlanan parafin bloklardan 4 veya 5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler boyama aşaması için ilk olarak 3 kez 15 dakika ksilolden geçirilmiş ve sonrasında ksilolün uçması beklenmiş, sırasıyla azalan alkol dereceleri olan %96 ve %80 alkolde 15 dakika bekletilmiş ve sonrasında akarsuda 2 kez yıkama yapılımış, 7

dakika hematoksilende bekletilmiş ve akarsuda 3 kez yıkamanın ardından asit alkole batır çıkar yapılmış ve akarsuda 2 kez yıkama yapılmış ve amonyaklı suya batır çıkar yapılmış ve akarsuda 2 kez yıkama yapılmıştır. Eozinde bir dakika tutulan preparatlar sonrasında sırasıyla %80 alkol ve %96 alkol içinde 1 dakika tutulmuştur. Preparatlar kapatılmadan önce 45 dakika ksilol içerisinde bekletilmiş ve sonrasında entellan kapama solüsyonu ile preparatlar kapatılmıştır.

Işık mikroskop ile damarların yapısal ve sayısal değişimi, bağ dokusu değişimi, müsküler arter gelişimi ve tabakaları,arteriyol görülme zamanı ve çapı, arter ağı oluşumu değerlendirilmiştir. Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ve toluidin mavisi ile boyanan yarı ince kesitler Leica DFC 500 dijital kamera bağlı olan ışık mikroskop ile (Leica DM 3000, Almanya) fotoğraflanmıştır.

3.6. Transmisyon Elektron Mikroskop İncelemesi İçin Kullanılan Çözeltilerin/Boyaların Hazırlanışı

3.6.1. %2'lik Gluteraldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanması

8 ml %25'lik gluteraldehit 92 ml Sorenson fosfat solüsyonuna (tamponuna), eklenerek 100 ml fosfat tamponlu %2'lik gluteraldehit tespit solüsyonu hazırlanmıştır.

Sorenson' un fosfat solüsyonunun hazırlanması:

Kimyasal Adı	**Miktar**
Sol. A: $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Sodyum fosfat dibazik)	0,946 gr
Distile su	100 ml
Sol. B: KH_2PO_4 (Potasyum fosfat monobazik)	0.0906 gr
Distile su	100 ml

Solüsyon A'dan 80 ml + Solüsyon B'den 20 ml birbirine eklenerek elde edilen 100 ml solüsyon gerektiğinde bu solüsyonlardan ilave edilerek pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.6.2. Osmiyum Tetroksit Solüsyonunun Hazırlanması

%2'lik Osmiyum Tetroksit solüsyonunu hazırlamak için:

Kimyasal Adı	**Miktar**
OsO_4 (Osmiyum tetroksit)	0.1 gr
Distile su	5 ml

Bir kısım Sorenson fosfat tamponu ve bir kısım %2'lik osmiyum tetroksit karıştırılarak ikinci tespit *(post-fiksasyon)* solüsyonu elde edilmiştir.

3.6.3. Elektron Mikroskop Gömme Materyalinin Hazırlanması

Kimyasal Adı	**Miktar**
Araldit Resin CY 212	10 ml
Dodesenil süksinik anhidrit (DDSA)	10 ml
Benzildimetilamin (BDMA)	0.5 ml
Dibütil fitalat	1 ml

3.7. CAM Doku Örneklerinin Elektron Mikroskop İle Değerlendirilmesi Takibi

Elektron mikroskop takibi için dokular ilk adım fiksasyon için %2 gluteraldehit içerisine alınmıştır. 48 saat gluteraldehit içerisinde bekleyen dokular 1 mm^3 büyüklükte parçalara ayrılarak Sorenson's fosfat tamponu (SPB) ile 15 dakika süreyle 3 kez yıkanmıştır. Ardından dokular ikinci fiksasyon (*post-fiksasyon*) için 1:1 oranda olacak şekilde ozmiyum tetraoksit:SPB tamponu içerisinde kararana kadar 1 saati aşamayacak şekilde tutulmuştur ve sonrasında SPB tamponu içerinden gece boyu oda sıcaklığında dokular bırakılmıştır. Ertesi gün yıkama tamponundan alınan dokular dehidrasyon amacıyla artan alkol serisinde sırasıyla %25 alkol 10 dakika, %50 alkol 10 dakika, %75 alkol 10 dakika ve %100 alkol 4 kez yarım saat olmak üzere beklemiştir ve süre sonunda 1,2 propilen oksit ile 3-4 kez yıkama yapılmıştır. Dokular yıkama sonrasında oranı 1:1 olacak şekilde 1,2-propilen oksit:gömme materyali içerinde rotatorda 2 derecede yarım saat döndürülmüştür ve sonrasında toplam hacim kadar gömme materyali eklenerek döndürme işlemine 2 saat daha devam edilmiştir. Böylece gömme materyalinin doku içine geçişi sağlanmıştır. Son olarak dokular saf

karışım ile gömme kapsülüne gömüldü. Süre sonunda dokular 56 ^{0}C etüv içinde 48 saat bekletilmiştir. 1000 nanometre (nm) ince kesitleri alınarak elektron mikroskop görüntüleme için kurşun sitrat ile boyama yapılmıştır.

Hazırlanan bloklardan ultramikrotom (Leica, UltraCut R, Almanya) ile elektron mikroskop için incelenecek bölgelerin seçimi için 1,5 μm'lik yarı ince kesitler alınmıştır ve %1 toluidin mavisi solüsyonu ile boyanmıştır. Seçilen bölgelerden 70-90 nm'lik ince kesitler 100 ya da 200 mesh'lik bakır gridler üzerine alınmış ve alınan kesitler elektron mikroskop incelemesi için, konstrast sağlaması amacıyla uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır. İnce kesitler Gatan Orius SC-1000 dijital kamera bağlı olan geçirimli elektron mikroskop (Jeol JEM 1400, Japonya) ile incelenmiştir. İnce kesit incelemeleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yapılmıştır.

Elektron mikroskop analizleri için E7, E8, E12, E15, E20 günleri yarı ince kesit gözlemleri dikkate alınarak çalışılmıştır. Elektron mikroskop gözlemleri ile hem koryonik hem de allantoik epitelde değişimler, endotel hücre değişimleri, mezenkim ve epitel dokusunun kalınlığı ve mezenkimal hücrelerin değişimi gözlenmiştir.

3.10. Primer Dizaynı

RT-PCR için ileri *(forward)* ve geri *(reverse)* primerlerinin dizaynı yapılmıştır. VEGF-A, VEGR-2, FGF-2, FGFR-2 primerleri primer dizayn aracı kullanılarak (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ve GAPDH, CNP-3, NPR-B primerleri önceki çalışmamızdan elde edilen sekanslara uygun şekilde çalışılmıştır. Primerlerin özellikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tablo 1. VEGFA, VEGFR2, bFGF, FGFR2, CNP, CNP-B gen ifadelenmesi için seçilen antikorlar.

Hedef Gen	**Kullanılan Primer Sekansları**	**Ürün**	**Gen Bankası Ulaşım Numarası**
VEGF-A	F: CGGAAGCCCAACGAAGTTATC R: CCTTCCCCTTTCCTCGCTTT	349 bç	NM205042.2
VEGFR-2	F: AGTCATAGGCAACGACACCG R: TGCACGCTTTTCCTTGATGG	529 bç	NM001004368.1

FGF-2	F: AAGCGGCTCTACTGCAAGAAC R: TTGGTCCGGGCTTGTACTGT	325 bç	NM205433.1
FGFR-2	F: CAGCTGACTCAAGCTCCTCC R: CATACAGCGGACCATCCTGG	393 bç	NM205319.2
CNP-3	F: AAGAGAGGGATCGTGAGCAA R: TCCTGGACAGACCCTTTTTG	201 bç	XM427055
NPR-B	F: GCCTGCTCCGAGTACGTG R: GTGCAGGTGGGAGACGAA	252 bç	XM427055
GAPDH	F: AGTCATCCCTGAGCTGAAG R: AGGATCAAGTCCACAACACG	330 bç	J00849

3.11. CAM Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu analizinde cDNA sentezi için kullanılmak üzere CAM örneklerinden RNA izole edilmiştir. Bu amaçla CAM doku örnekleri RNA izolasyonu yapılıncaya kadar Trizol içerisine alınıp -20 ^{0}C buzdolabına kaldırılmıştır. RNA izolasyonu fenol/kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Trizol içerinden küçük parçalara ayrılan doku parçaları 2 ml'lik ependorf içerisine alınmış sonrasında vortkslenmiş ve kısa bir santrifüj sonrası üst faz ayrı bir tüpe alınmıştır. Alınan üst faza oda sıcaklığında 200 mikrolitre (µl) kloroform eklenmiş ve 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Ardından oluşan üç faz içinden en üstteki berrak faz ayrı bir tüpe alınarak üzerine 100 µl fenol eklenmiş ve örnekler -20 ^{0}C'ye kaldırılmıştır ve 6 saat boyunca beklenmiştir. Ardından +4 ^{0}C'de 14000 rpm 15 dakika santrifüj yapılmıştır ve üst faz çekilerek altta kalan pelet üzerine %70 soğuk ethanol eklenmiştir. Ethanol ile yıkama +4 ^{0}C'de 14000 rpm 10 dakika süreyle yapıldıktan sonra üst faz dökülmüştür ve pelet DNaz-RNaz nükleazlarını içermeyen su ile sulandırılmıştır.

RNA miktarı, nanodrop kullanılarak 260/280 nanometrede (nm) yapılan saflık ölçümleri ile (≥2) tayin edilmiştir.

3.12. cDNA Sentezi ve RT-PCR

RNA izolasyonu sonrasında cDNA sentez kiti (abm, g#236) ile cDNA sentezlendikten sonra Tablo.1 'de belirtilen primerler kullanılarak RT-PCR analizi

yapıldı. Gelişim evrelerine göre VEGF, VEGFR2, bFGF, FGFR2, CNP-3 ve reseptörü NPR-B mRNA ekspresyonlarının artış ya da azalışının normalize edilmesi için referans gen olarak gliseraldehit 3-*fosfat dehidrojenaz* kullanıldı.

cDNA sentez protokolü:

Kullanılanlar	**Miktar**	**Konsantrasyon**
RNA	1 µl	1000ng/ µl
Oligo(dT)	1 µl	0.5-1 µM
dNTP karışımı	1 µl	500 µM
Nükleaz içermeyen su	11.5 µl	

Reaksiyonu 65 ^{0}C 5 dakikada ve 4 ^{0}C'de 1 dakika tuttuktan sonra, santrifüj yapılıp belirtilen adımlar atkip edilir:

Kullanılanlar	**Miktar**	**Konsantrasyon**
5X RT tamponu	4 µl	1X
Ribonükleaz inhibitörü	0.5 µl	20U/rxn
Reverse transkriptaz	1 µl	200U/rxn

Toplam 20 µl olan reaskiyon hacmi cDNA sentezi için programa konur. Bu program: 50 dakika 50 ^{0}C, 5 dakika 85 ^{0}C şeklindedir. Elde edilen cDNA -20 ^{0}C'de uzun süreli saklama koşullarına uygun olarak kaldırıldı.

cDNA çalışılacağı zaman aşağıda belirtilen protokol ile primerlerin değişen bağlanma (T_m) derecesine göre RT-PCR döngüsü hazırlandı. Tablo 2'de GAPDH ve CNP-3 için ve Tablo 3'de VEGFA, VEGR2, FGF2, FGFR2, NPR-B için olan RT-PCR döngü koşulları gösterilmiştir.

Tablo 2. GAPDH ve CNP-3 için hazırlanan RT-PCR protokolü

Ön denatürasyon	95 ^{0}C, 12 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 ^{0}C, 1 dakika	27 döngü
Bağlanma	55 ^{0}C, 1 dakika	
Uzama	72 ^{0}C, 1 dakika	
Son uzama	72 ^{0}C, 10 dakika	1 döngü
Saklama koşulları	+4, ∞	∞

Elde edilen PCR ürünü, 5 µl PCR ürünü ve 2 µl yükleme boyası olacak şekilde %1'lik 2 µl etidyum bromür içeren agaroz jele yüklenerek 1x tris borik asit edta içerisinde elektorforez ortamında 55 dakika 90V ile yürütülmüştür ve jel görüntülemesi ChemiDoc-It, UVP görüntüleme cihazı ile yapılmıştır. Oluşan ürünlerin uzunlukları 100 bp plus Opti-DNA (Abm, Canada) belirteci kullanılarak tayin edilmiştir. PCR ürünlerinin dansitometrik analizleri Image J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (https://imagej.nih.gov/ij/download.html). Her gelişimsel güne ait spesifik gen ifadeleri, aynı güne ait GAPDH ölçüm sonucu kullanılarak normalize edilmiştir ve sonuçlar grafikler şeklinde sunulmuştur.

Tablo 3. VEGFA, VEGR2, FGF2, FGFR2, NPR-B için hazırlanan RT-PCR protokolü

Ön denatürasyon	95 ^{0}C, 12 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 ^{0}C, 1 dakika	30 döngü
Bağlanma	59 ^{0}C, 1 dakika	
Uzama	72 ^{0}C, 1 dakika	
Son uzama	72 ^{0}C, 10 dakika	1 döngü
Saklama koşulları	+4, ∞	∞

3.13. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar, Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan kimyasallar, sarflar, kitler ve cihazların listesi aşağıdaki belirtilmiştir.

Kimyasal Adı	**Markası**
Araldit Resin CY 212	Agar Scientific, R1042
Benzildimetilamin (BDMA)	Agar Scientific, R1920
Bibütil fitalat	Agar Scientific, R1071
Dodesenil süksinik anhidrit (DDSA)	Agar Scientific, R1053
EDTA	Sigma, E9884
Entellan	Merck, 1.170961.0500
Etanol	Merck, 100967.2500 .1
Formaldehit	Merck, 103999
Fosfat Tamponlu Tuz tablet	Sigma, P4417
Gluteraldehit	Sigma, 354400 (%25)

Hidrojen peroksit	Merck, 1.07209.1000
İzopropanol	Sigma, I9516
Kloroform	Sigma, C2432
Ksilol	Sigma, 1330-20-7
Metanol	Sigma, 34885
Osmiyum tetroksit (OsO_4)	Electron Microscopy Science, 19110
Parafin	Tudamelt, 58/60
Formaldehit	Merck, K35394402.547
Sitrat tamponu	biorbyt, orb90542
Trizol	Sigma, T9424
DNA Loading Dye	abm
Cihaz/Sarf Malzeme Adı	**Markası**
1-10 µl pipet ucu	NestScientific, 312012
100-1000 µl pipet ucu	NestScientific, 312013
-80 ^{0}C derin dondurucu	ThermoScientific
Buzdolabı	Arçelik
Çeker ocak	Headlab
Ependorf , 2ml	SSIbio 1310-00
Etüv	Nüve
Falkon, 15 ml	Microcult, 231010
Jel Görüntüleme Sistemi	ChemiDoc-It, UVP
Mini santrifüj	VWR, ministar
Mikrodalga fırın	LG, iwave
Mikropipet seti	Brand
Mikrotom	ThermoScientific, Finesse 325
PCR reaksiyon tübü	SSIbio 3225-00
Soğutmalı santrifüj	Hettich, Universal 320R
Su banyosu	Apex İnstruments
Termal Döngü Cihazı	BlueRay BioTech
Ters (Inverted) Mikroskop	Leica, DM3000
Geçirimli Elektron Mikroskop	Jeol JEM 1400
Elektroforez tankı	(VWR Power Source)
Vorteks	ThermoScientific

Kitin Adı	**Markası**
cDNA sentez kiti	abm G236
Solüsyonlar	**Markası**
Multiplex PCR master mix	SolisBioDyn

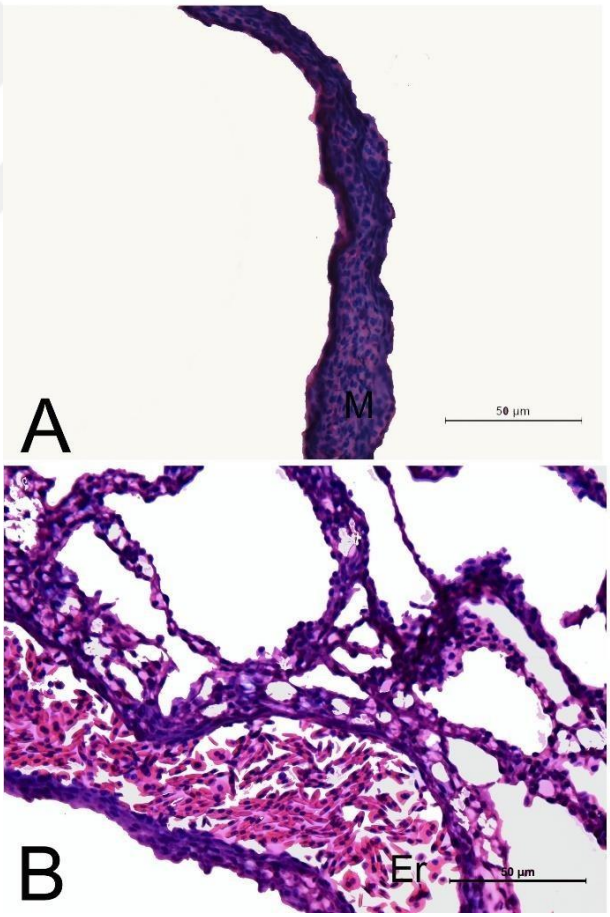
4. BULGULAR

4.1. CAM Doku Örneklerinin Işık Mikroskop İle Değerlendirilmesi

CAM doku örnekleri ışık mikroskop gözlemi için hem Hematoksilen-Eozin boyama ile hem de toluidin mavisi boyama ile (yarı ince) boyanmıştır.

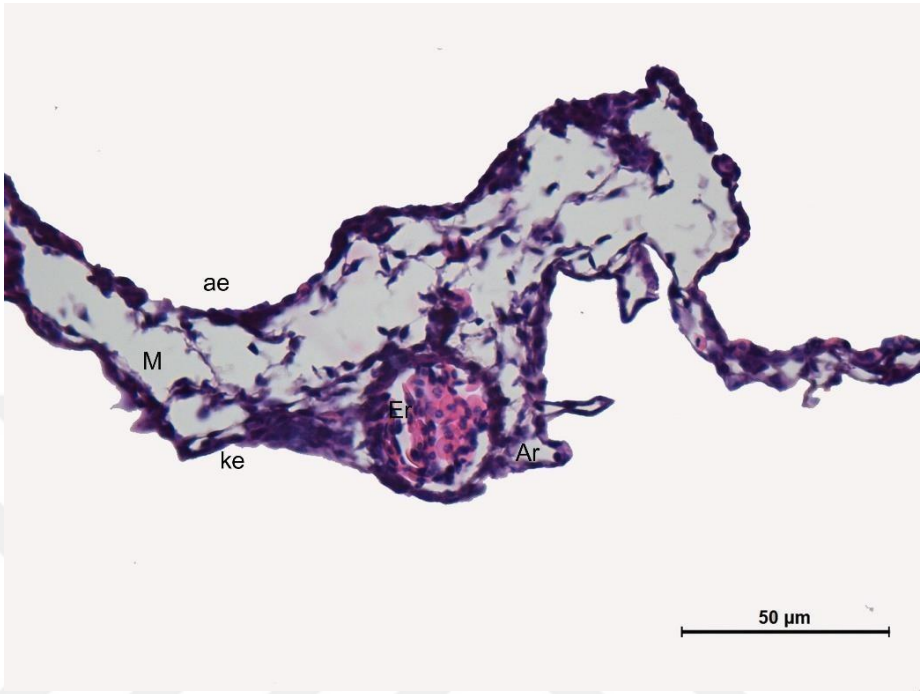
Hematoksilen-Eozin boyama ile ilgili bulgular:

E7'de, koryonik ve allantoik epitel tabakaları arasında ince bir mezenşim gözlenmiştir. Koryonik ve allantoik epitelin de ince olduğu görülmüştür (Şekil 4.1-A. X400, skala bar: 50µm). Mezenşimin ve CAM yapısının oluşmuş olduğu ayırt edilmiştir (Şekil 4.1-A). Kan hücrelerinin varlığı dağınık şekilde gözlenmiştir (4.1-B. X400, skala bar: 50µm). Mezenşim (M), Er (eritrosit).



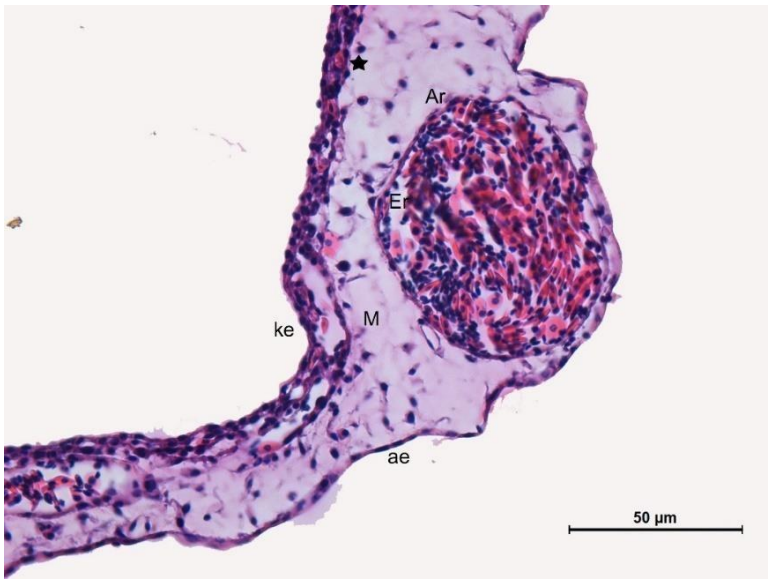
Şekil 4. 1. A) E7'de koryonik ve allantoik epitel ve mezenşim görüntüsü B) Kan hücrelerinin görüntüsü.

E8’de koryonik ve allantoik epitelin E7’ye kıyasla daha belirgin olduğu ve mezenşimin kalınlaştığı, içerisinde lümen benzeri odakların oluştuğu görülmüştür. Ayrıca arteriyol yapısında belirgin kan damarı yapısı gözlenmiştir (Şekil 4.2. X400, skala bar: 50µ). Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), arteriyol (Ar), eritroist (Er).



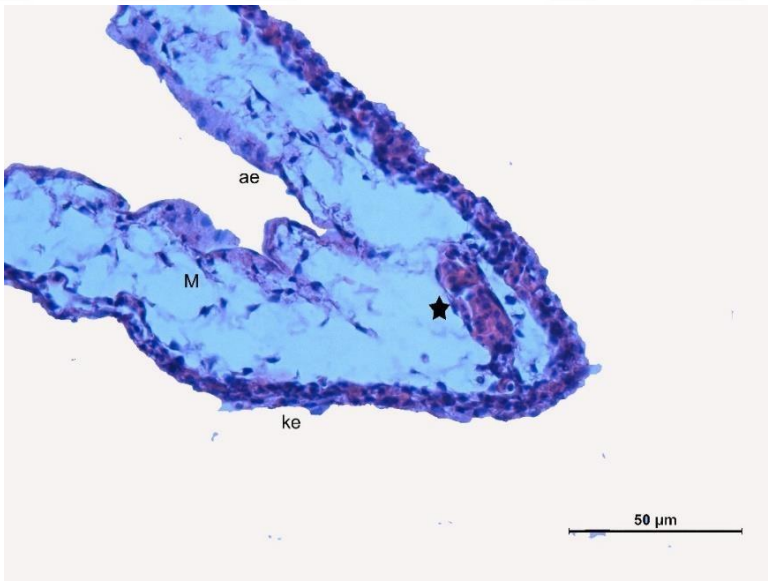
Şekil 4. 2. A) E8’de arteriyol yapısının gösterimi.

E9’da mezenşim kalınlığı artmıştır. Koryonik epitel içerisinde (intrakoryonik) kılcal kan damarı benzeri damar oluşumları gözlenirken (*); mezenşim içerisinde de lümeni belirgin ve kan hücreleri ile dolu olan arteriyol görülmüştür (Şekil 4.3. X400, skala bar: 50µm). Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), arteriyol (Ar), eritroist (Er).



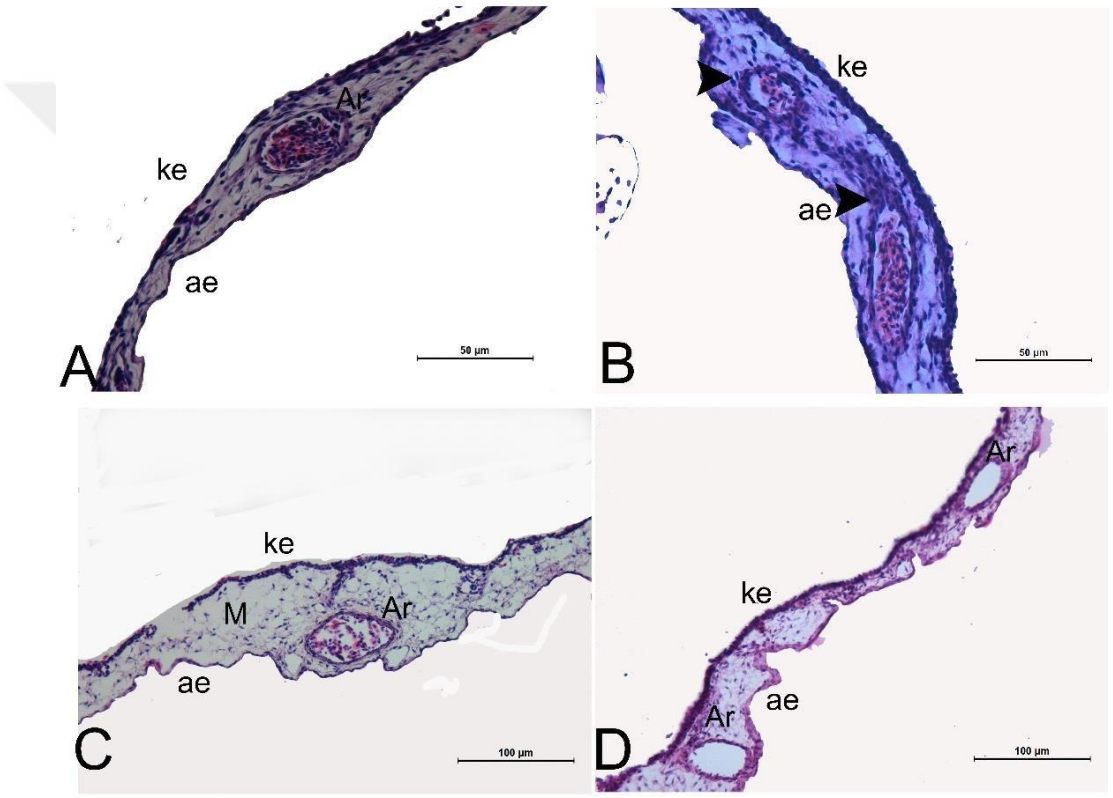
Şekil 4. 3. E9'da CAM görünümü.

E10'da koryonik epitele çok yakın hatta neredeyse epitelin devamı gibi konumlanan damar yapıları gözlenmiştir (*) (Şekil 4.4. X400, skala bar: 50µm). Koryonik epitel kalınlığının ve mezenşim kalınlığının E9 ile benzer olduğu görülmüştür. Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), mezenşim (M).



Şekil 4. 4. E10'da mezenşim kalınlığının ve koryonik epitel kalınlığının durumu

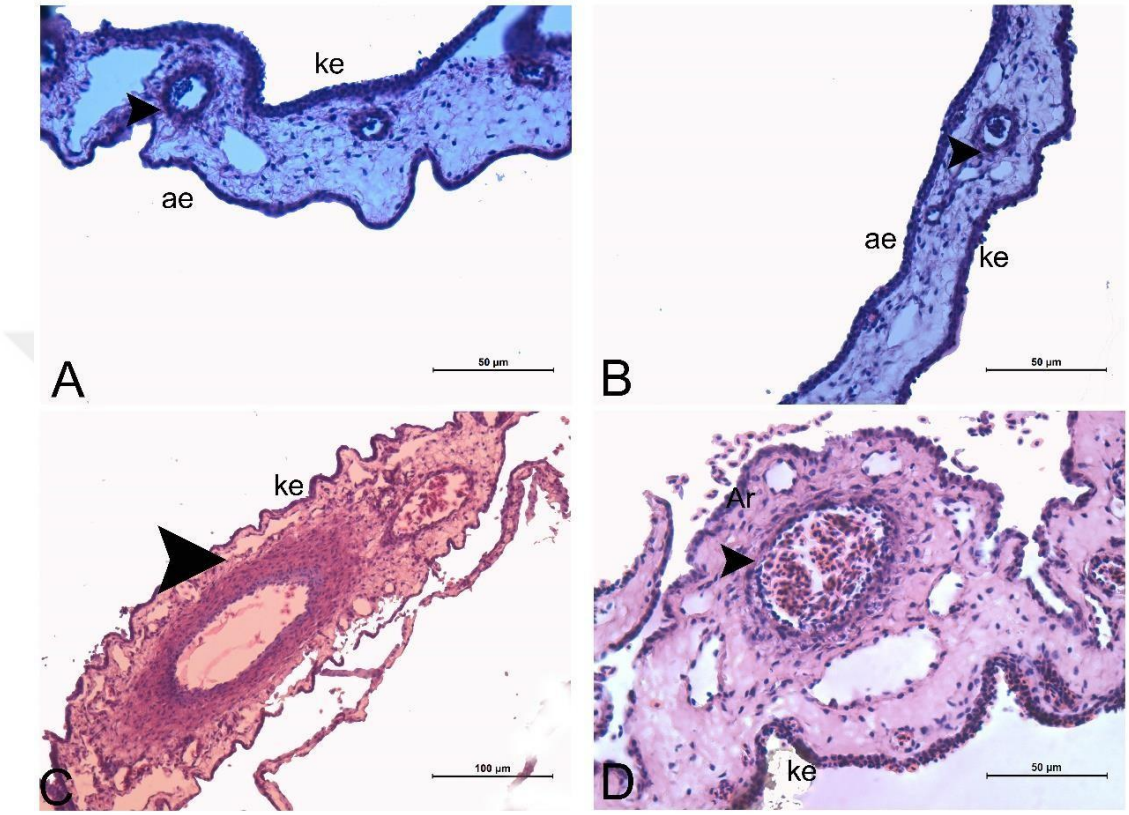
E11’de mezenşimin neredeyse tamamını kaplayan arteriyollerin varlığı görülmüştür (Şekil 4.5-A. X400, skala bar: 50µm). E12’de benzer bulgular elde edilmiştir; ancak kan damarlarının etrafında adventisya tabakasının oluşumu (ok başı), mezenşimde damarların artışı ve damarların lümeninde eritrositlerin sayısal artışı da görülmüştür (Şekil 4.5-B. X400, skala bar: 50µm). E13’de mezenşimin kalınlaşarak >50 mikron kalınlığa ulaştığı görülmüştür (Şekil 4.5-C. X200, skala bar: 100µm). E14’de ise E13 ile benzer damar yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.5.-D. X200, skala bar: 100µm). Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), arteriyol (Ar), mezenşim (M).



Şekil 4. 5. A) E11 CAM görünümü B) E12 CAM görünümü C) E13 CAM görünümü D) E14 CAM görünümü

E15-E17 arasında adventisyası oldukça belirgin düzeyde ayırt edilebilen gelişmiş kan damarları görülmüştür (ok başı). Ayrıca mezenşimde iğsi şekilleri ile belirgin olan bağ dokusu hücreleri de ayırt edilmiştir (Şekil 4.6-A, -B ve -D. X400, skala bar: 50µm). E16’de ilk kez adventisya tabakası ve media tabakası oldukça kalınlaşmış ve muskular arter şeklinde tanımlanabilecek gelişmiş damar yapısı gözlenmiştir (kalın ok başı) (Şekil 4.6-C. X200, skala bar: 100µm). E16 ve E17’de

özellikle gelişmiş damarların etrafında arteriyol kan damarları görülmüştür. Mezenşimin bu günlerde oldukça kalınlaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.7.-D. X400, skala bar: 50µm). E15-E17 arasında koryonik ve allantoik epitel belirgin olarak ayırt edilmiştir.



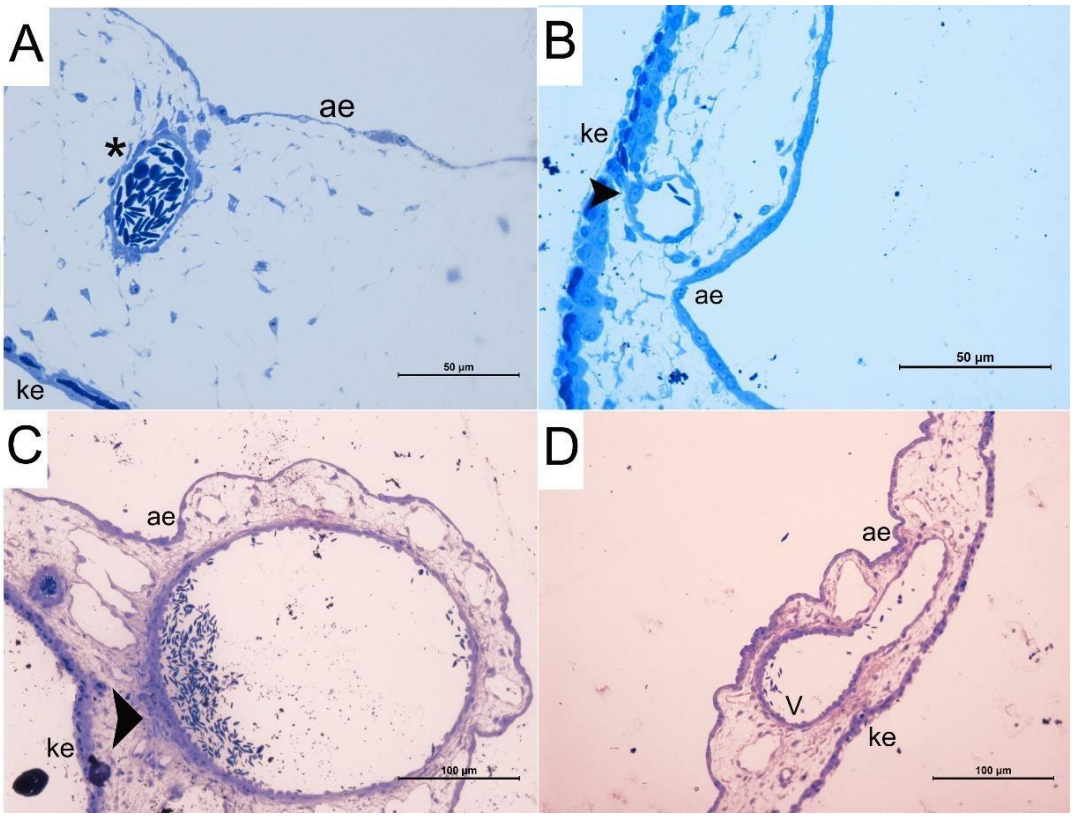
Şekil 4. 6. A) E15 kalınlaşan mezenşim ve damarların görüntüsü B) E15 kan damarları ve koryonik epitel görüntüsü C) E16 muskular arter ve arteriyollerin görüntüsü D) E17 gelişmiş kan damarı ve arteriyol görüntüsü.

E15 ve E17 arasında görülen gelişmiş damarlar E18 itibariyle gözlenmemiştir. E18 itibariyle mezenşim tekrar incelmiştir ve özellikle allantoik epitelde kalınlaşmalar olduğu gözlenmiştir. E18 ve E19'da mezenşim oldukça incelmiş ve yumurta zarına neredeyse birleşik olan CAM yapısı ile birlikte yumurta zarının da boyandığı görülmüştür. E18-E20 arasında daha çok mezenşimde çeşitli büyüklüklerde arteriyol benzeri damar yapılar dağınık olarak gözlenmiştir.

Toluidin mavisi ile ilgili bulgular:

E7 itibariyle giderek kalınlaşan bir mezenşim ve daha çok intrakoryonik veya koryona yakın yerleşimli görülen arteriyol benzeri (yıldız işareti*) damarlar gözlenmiştir (Şekil 4.7-A. X400, skala bar: 50µm). E12'de koryondan filizlenme

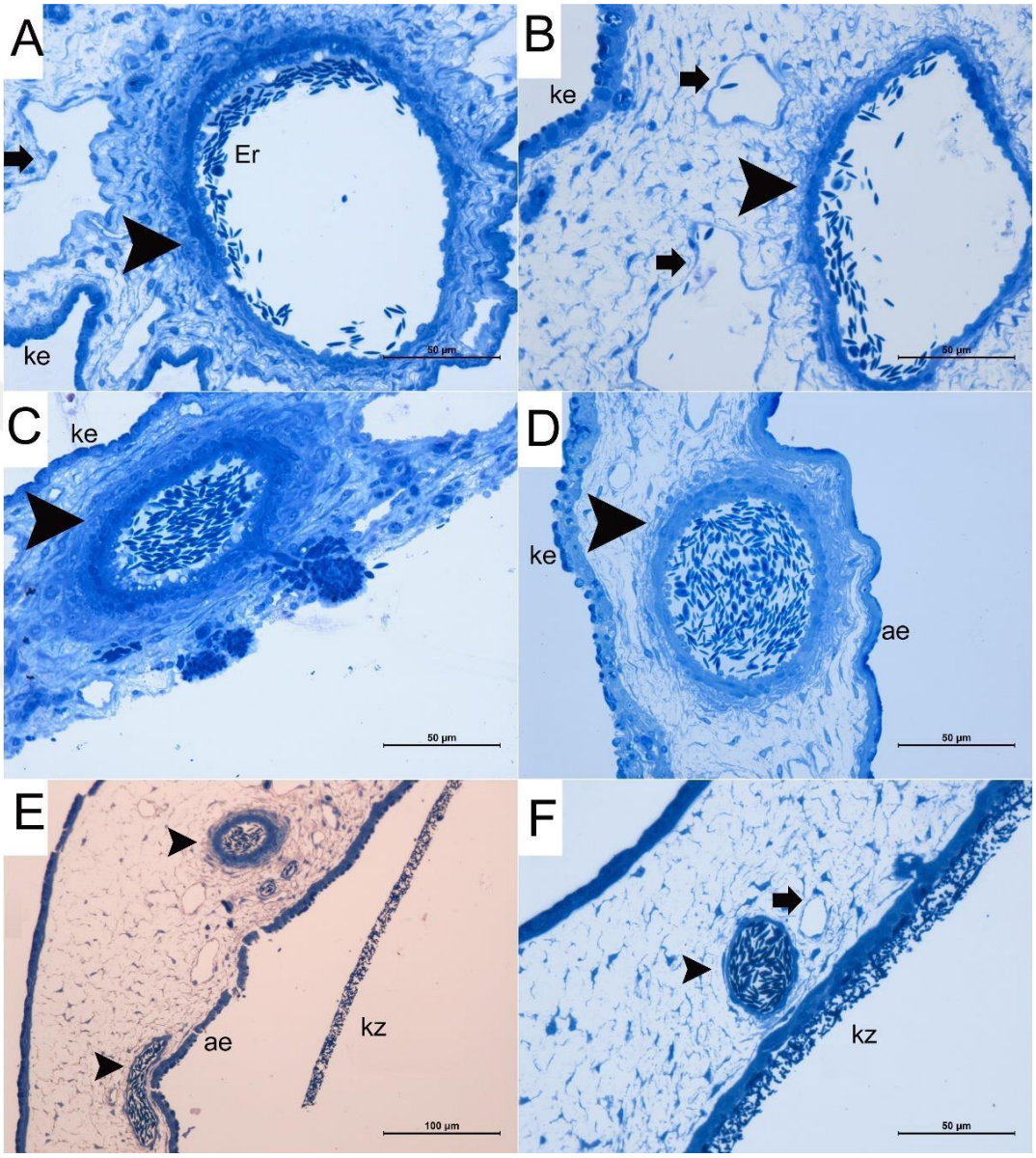
şeklinde veya koryona doğru invazyon şeklinde arteriyol yapısı gözlenmiştir (Şekil 4.7-B. X400, skala bar: 50µm). E12'de ana kan damarlarının çapının arttığı ve mezenşimden farklılaştığı öngörülen düz kas hücreleri ile bu damarların etrafının sarıldığı ve stabilize edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.7-C. X200, skala bar: 100µm). E13'de mezenşimde orta büyüklükte ven yapıları görülmüştür (şekil 4.7-D. X200, skala bar: 100µm). Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), eritrositler (Er), ven (V).



Şekil 4. 7. A) E7'de yeni oluşan endotel tüp yapılarının mezenşim içerisinde görünümü B) E12'de koryonik epitel altında ve mezenşim tabakasında görülen vasküler yapılar C) E12'de mezenşimde görülen muskuler arter yapısı D) E13'de mezenşimde ven damarı.

E15'de gelişmiş müsküler arter yapısı görülmüştür (Şekil 4.8-A. X400, skala bar: 50µm). Ayrıca yarı ince kesitte E15'de muskuler arter yapısının (kalın ok başı) ve yakınında ven (ok) olduğu görülmüştür. CAM mezenşim hücre yoğunluğunun ve buna paralel olarak CAM kalınlığının E15 ile E17 arasında arttığı görülmüştür (Şekil 4.8.-B ve -C, X400, skala bar: 50µm). Müsküler arterlerinin yapısı, tunika adventisyanın organizasyonu ile E15-E19 arasında daha fazla gelişme göstermiştir (Şekil 4.8-D. X400, skala bar: 50µm). E20'de gelişmiş arterlerin yerini arteriyol

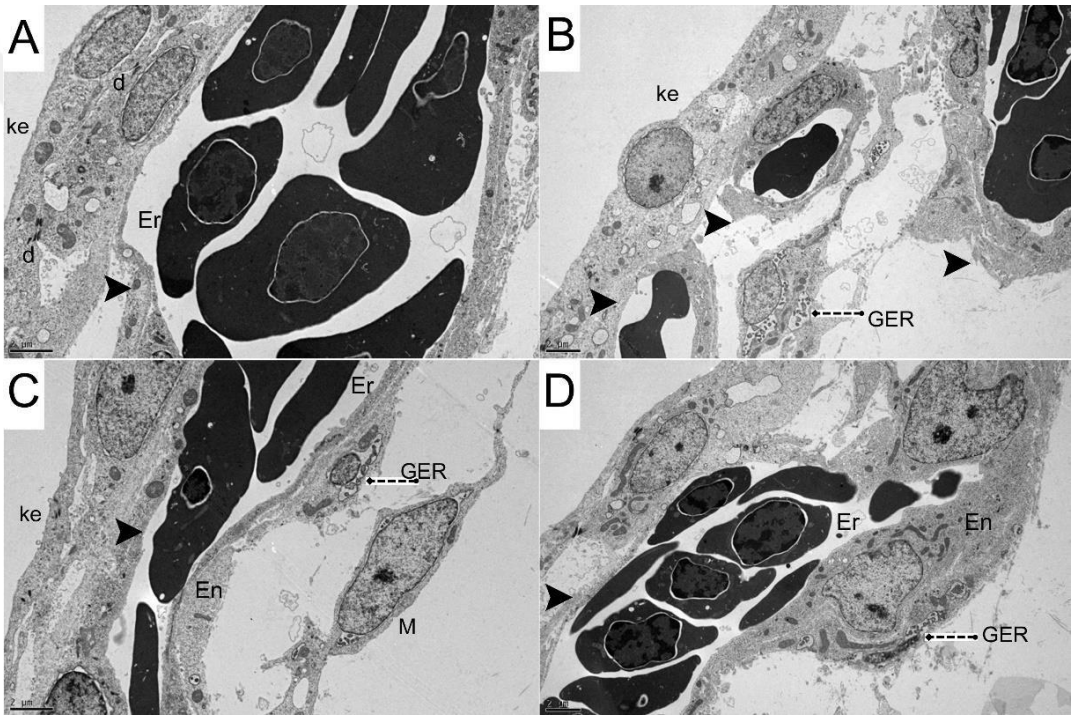
yapılarının aldığı görülmüştür (Şekil 4.8-E. X200, skala bar: 100µm). Ayrıca incelen CAM yapısının kabuk zarına oldukça yaklaşması nedeniyle kabuk zarının varlığı da görülmüştür (Şekil 4.8-F. X400, skala bar: 50µm). Allantoik epitel (ae), koryonik epitel (ke), eritrositler (Er), kabuk zarı (kz).



Şekil 4. 8. A) E15'te lümeninde eritrositler ve lümen etrafında belirgin tunika media bulunan müsküler arter yapısı komşuluğunda ven yapısının görüntüsü B) E16'da mezenşim tabakasında venöz yapılar ve gelişmiş müsküler arter görüntüsü C) E17 ve D) E19'da mezenşim tabakasında duvar yapısı gelişkin müsküler arter yapılarının görüntüsü E) ve F) E20'de koryonik epitel altındaki mezenşim tabakasında yoğunlaşan lümeni ve duvarı belirgin arter ve ven damar yapılarının görüntüsü.

4.2. CAM Doku Örneklerinin Elektron Mikroskop İle Değerlendirilmesi

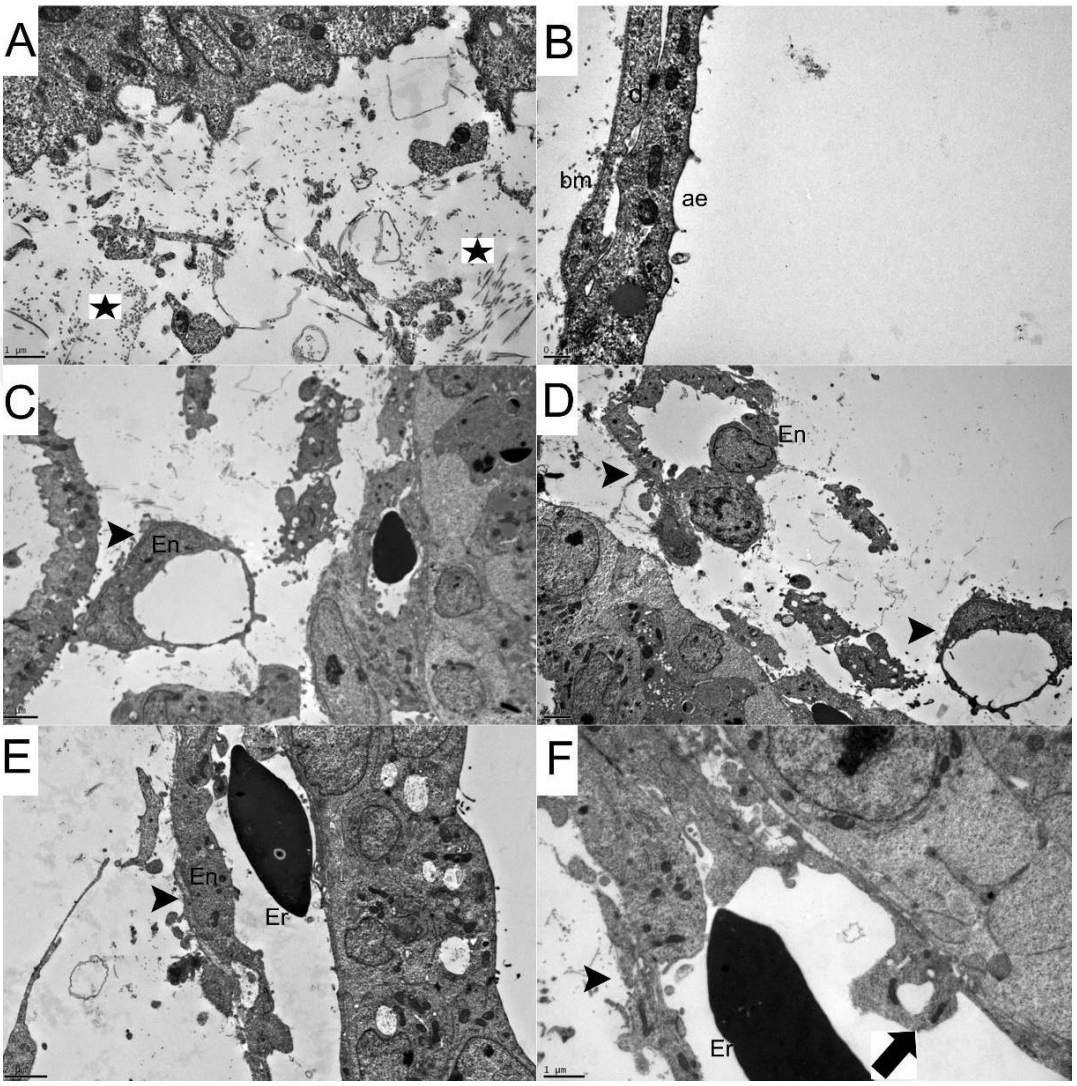
Kurşun sitrat ile boyanan ince kesitler elektron mikroskop ile görüntülenmiştir. E7'de CAM koryon epiteli altında ve mezenşim içeresinde endotel tüp yapıları gözlenmiştir (Şekil 4.9-A. 8000X). Koryonik epitel bu aşamada iki tabakalı olarak gözlenmiş olup, bu hücre tabakaları arasındaki desmozomlar (d) dikkati çekmiştir (Şekil 4.9-A. 8000X). Ek olarak, hem mezenşim hücrelerinde hem de endotel hücrelerinde perinükleer alanda konumlanan granüler endoplazmik retikulum (GER) gözlenmiştir (Şekil 4.9-B. 6000X, -C. 8000X ve -D. 6000X). Koryonik epitel (ke), mezenşim hücresi (M), eritrositler (Er), endotel hücresi (En).



Şekil 4. 9. A) E7'de Koryonik epitelin iki katlı görünümü ve desmozomlar B) Koryonik epitele komşu lokalizasyonda kılcal damar yapıları C) Koryona komşu yerleşimli damar endotelinin yakınına yerleşmiş mezenşim hücresi ve belirgin GER yapısı D) Perinükleer bölgeye lokalize GER yapısı (kesikli ok) belirgin endotel ile çevrili kan damarı görüntüsü.

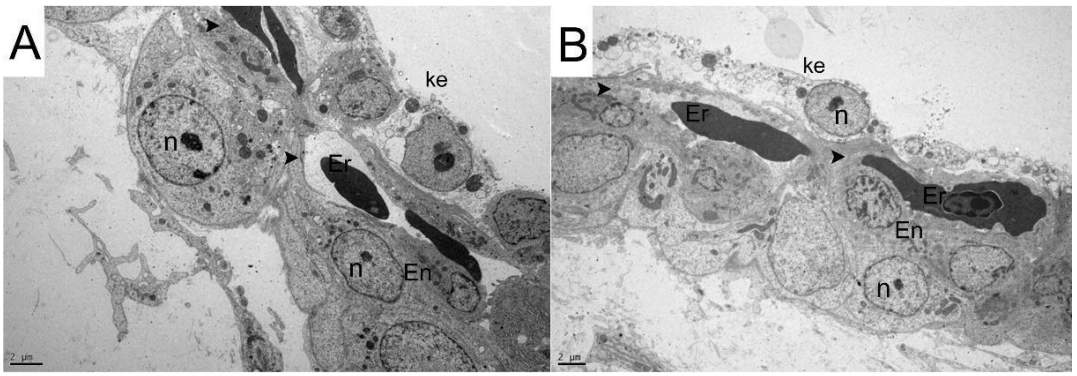
E8'de, CAM mezenşim tabakasında artmış kollajen sentezi görülmüştür (yıldız işareti *) (Şekil 4.10-A. X15000). Allantoik epitel hücreleri ve bazal lamina arasındaki desmozomlar, E8'de açıkça gözlenmiştir. Allantoik epitelde beklenildiği gibi damar oluşumuyla ilgili herhangi bir yapı gözlenmezken, lipid damlacıklarının varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.10-B. X20000). Kan damarları, E8'de mezenşimal doku içerisinde kolayca ayırt edilebilmiştir (Şekil 4.10-C. X6000 ve -D. X5000). Ek olarak, koryonik

epitel ile yakın temas halinde endotel tüp yapıları gözlenmiştir ve bu yapılarda intussuseptif anjiyogenezi düşündüren sütun benzeri oluşumlar görülmüştür (kalın ok) (Şekil 4.10-E. X8000 ve -F. X15000). Allantoik epitel (ae), bazal membran (bm), eritrositler (Er), endotel hücresi (En).



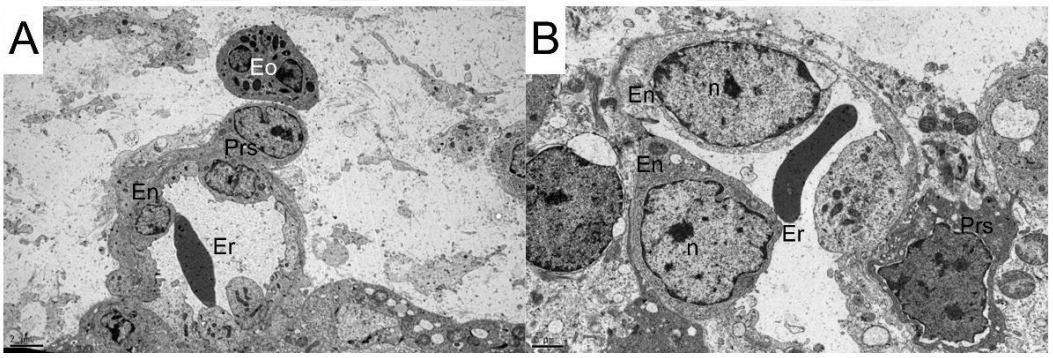
Şekil 4. 10. A) Mezenşim tabakasında kollajen lifleri B) Desmozomlar, lipid damlacıkları ve belirgin bazal membran C), D), E) Mezenşim içerisinde vasküler yapılar F) Endotel hücrelerinde oluşan sütun benzeri yapının görüntüsü.

E12'de koryonik epitel çok katmanlı bir yapıda görülmüştür ve kapiller benzeri tübül oluşumlar (ok başı ile gösterilen) dikkat çekmiştir (Şekil 4.11-A. X6000). Ayrıca nükleolus yapıları belirgin olan ve kapiller etrafında bulunan hücreler görülmüştür (Şelik 4.11-B. X5000). Koryonik epitel (ke), eritrositler (Er), endotel hücresi (En), nükleolus (n).



Şekil 4. 11. A) E12'de koryonik epitel hücreleri arasında sayıca artan ve yüzeye yakın konumlanan kılcal vasküler yapılar B) nükleolus yapıları belirgin olan hücrelerin görünümü.

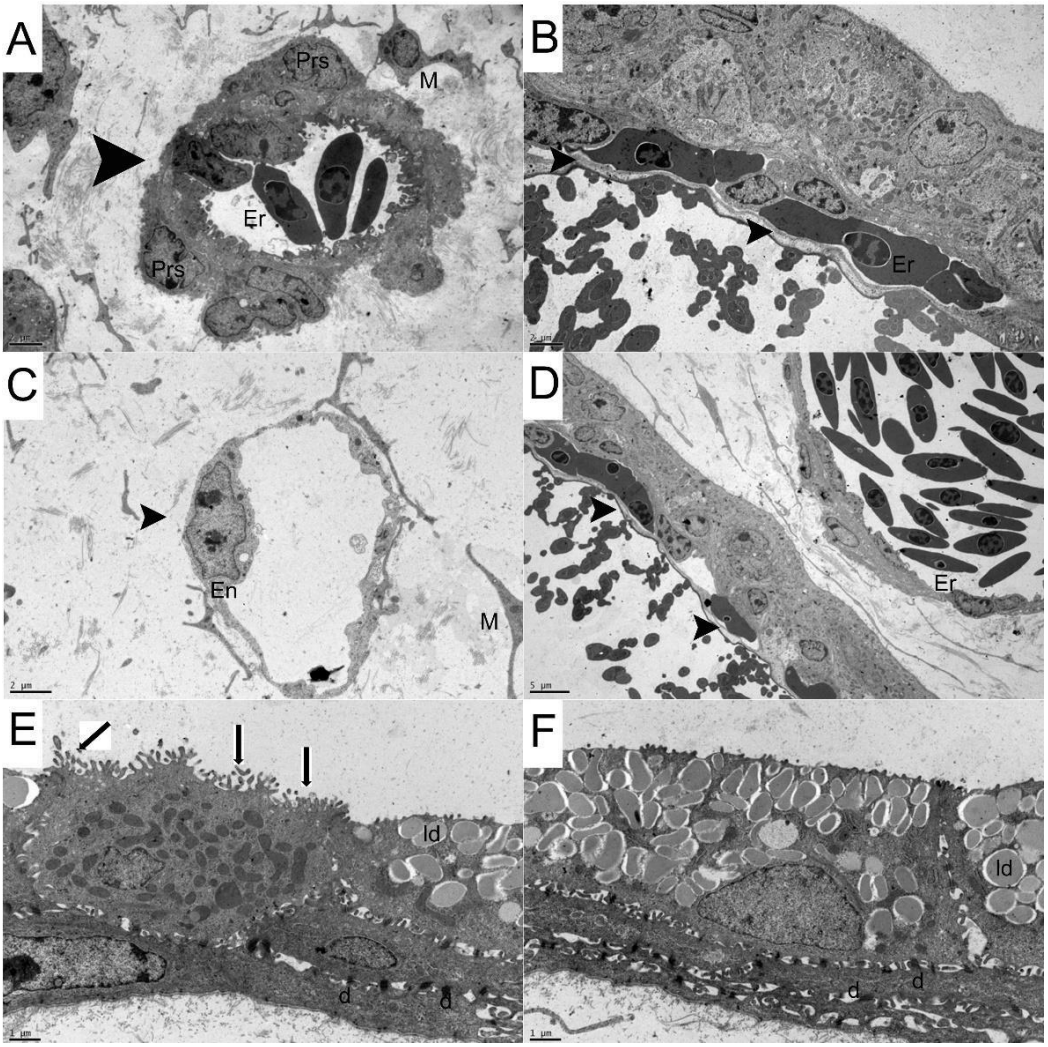
E15'de etrafı persitlerle çevrilmiş bir damar yapısı ve bu yapının bitişiğindeki binükleer hücre, eozinofil varlığı gözlenmiştir. Binükleer hücrenin eozinofil benzeri bir hücre olduğu görülmüştür (Şekil 4.12-A. X6000). E12'de olduğu gibi nükleolus yapıları belirgin endotel ile çevrilmiş bir lümeni ve perisitleri bulunan vasküler yapı görülmüştür (Şekil 4.12-B. X12000). Eritrositler (Er), nükleolus (n), endotel hücresi (En), perisit (Prs), eozinofil benzeri hücre (Eo).



Şekil 4. 12. A) E15'de mezenşimde vasküler yapı B) Perisitler ile çevrili gelişmiş vasküler yapı.

E20'de E15'e göre daha gelişmiş ve mezenşime yerleşmiş kan damarları görülmüştür (Şekil 4.13-A. X6000). Ayrıca, koryonik epitel altında ve yakın komşuluğunda yayılım gösteren endotel tüp yapısındaki kan damarları da gözlenmiştir (Şekil 4.13-B. X6000). CAM mezenşiminde farklı büyüklükte kan damarları görülmüştür (Şekil 4.13-C. X8000 ve -D. X3000). Bu durum vasküler organizasyonun kompleks bir yapıya eriştiğini düşündürmüştür.

E20 için en çarpıcı bulgu, hem allantoik hem de koryonik epitellerin çok katmanlı yapısının ve bu epitel hücreleri arasında desmozomların gözlenmiş olmasıdır. Koryonik epitel yüzeyindeki parmak benzeri uzantılarla çok katlı bir görünüm sergilerken (Şekil 4.13-E. X12000); allantoik epitel daha fazla katlı bir görünüme sahip olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.13-F. X12000).



Şekil 4. 13. A) E20'de mezenşim içinde arter benzeri gelişmiş vasküler yapı B) koryon epiteli komşuluğunda sayıca artış gösteren kapiller vasküler yapılar C) Mezenşim içerisinde bir vasküler yapı D) mezenşimde daha kalın bir duvara ve geniş lümene sahip kan damarı E) Koryonik epitelin yüzeyinde parmaksı çıkıntılar F) Desmozomlar ve lipid damlacıkları gözlenmiştir

4.3. CAM Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu trizol içerisinde saklanan dokulardan fenol-kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucunda hem ng/µl konsantrasyon değeri hem de 260/280 nm ölçümünde RNA saflık değerinin ≥2 olması göz önüne alınarak kalıp RNA seçimi yapılmıştır.

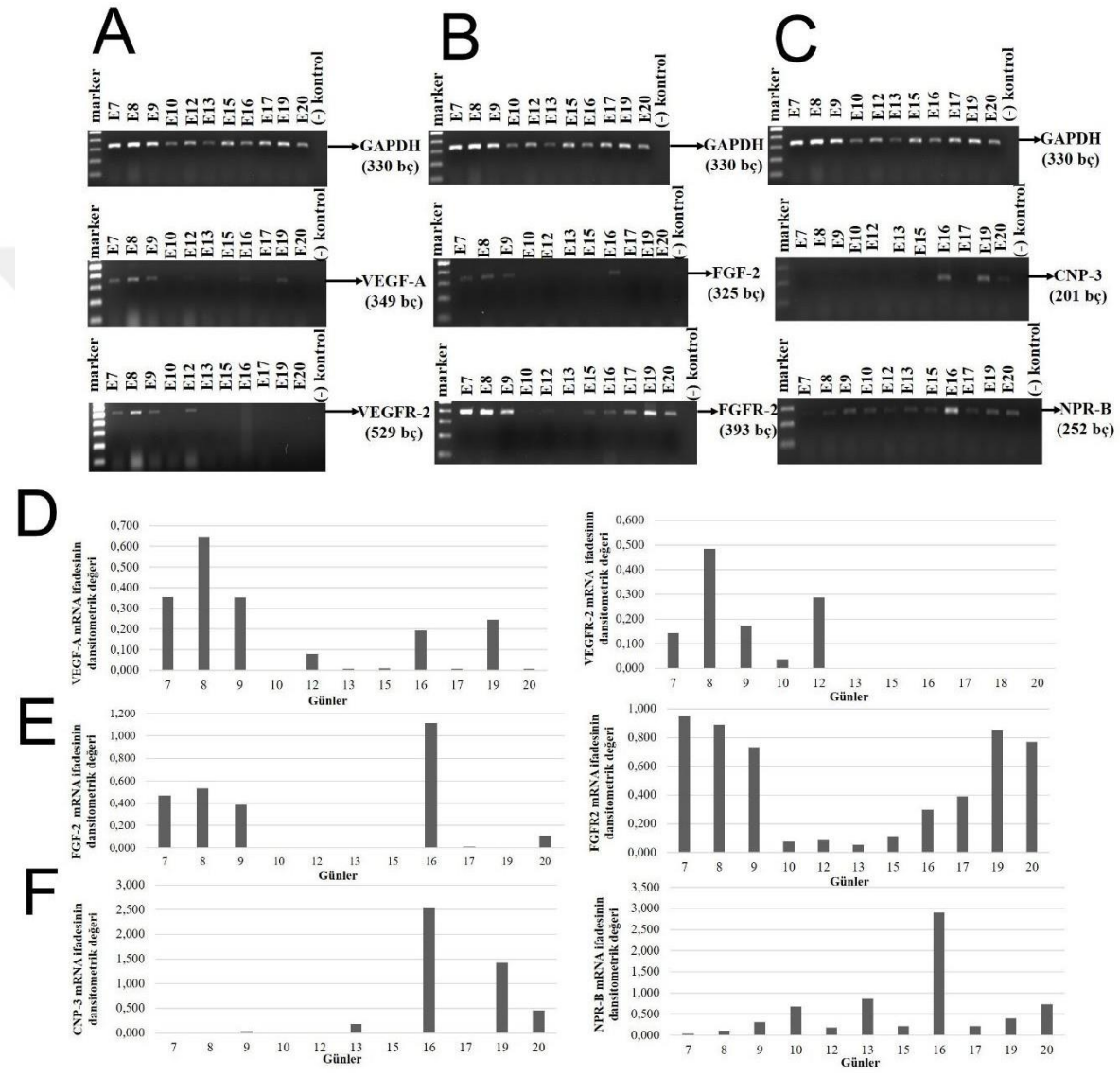
4.4. VEGF-A, VEGFR-2, FGF-2, FGFR-2, CNP-3 ve NPR-B mRNA Düzeylerinin Ölçülmesi

CAM gelişimi sürecinde görülen vasküler yapılanmaya paralel olarak, VEGF-A, FGF-2 ve CNP-3 ve bu ligandların reseptörleri olan VEGFR-2, FGFR-2 ve NPR-B'nin zamana bağlı mRNA ifade düzeyleri RT-PCR ve etidyum bromür boyalı agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Elde edilen dansitometrik analiz sonuçları aynı zaman noktalarına karşılık gelen GAPDH (330bç) ölçüm değerleri kullanılarak normalize edilmiştir.

VEGF-A 349 baz çifti (bç) olarak bant vermiştir (Şekil 4.15-A). VEGFR-2 ise 520 bç'de bant vermiştir. VEGF-A mRNA ifadesi, bazal seviyede ölçüm yapılan günlerde ifadelenmiştir (Şekil 4.15-A). Ancak en belirgin değerlerini rseptörü olan VEGFR-2 ile birlikte E7-E9 arasında göstermiş olup E8'de her iki mRNA ifadesinin de pik yaptıkları görülmüştür (Şekil 4.15-A). Sonrasında VEGF-A ifadesinin E10-E15 arasında azaldığı tespit edilmiştir. VEGFR-2 mRNA ifadesi ise, E12'den sonra azalmış ve kaybolmuştur. VEGF-A mRNA ifadesinde E16-E19 arasında ikinci bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.15-A).

FGF-2 ve reseptörü sırasıyla 325 bç ve 393 bç olarak bant vermiştir (Şekil 4.15-B) FGF-2 mRNA ifadesi, reseptörü olan FGFR-2 ile uyumlu olacak şekilde E7-E9'da gözlenmiş olup, E8'de her ikisinin de pik yaptıkları görülmüştür. FGF-2'nin mRNA ifade düzeylerinin VEGF-A gibi E10-E15 arasında azaldığı tespit edilmiştir. Sonrasında FGF-2 mRNA ifadesi E16 ve E20'de görülmüş olup E16'da pik yapmıştır. FGFR-2 için çalışılan gelişim günlerinde değişen düzeylerde daima mRNA ifadelenmesi görülmüştür. FGFR-2 mRNA ifadesi E15-E20 arasında kademeli olarak artmış ve E8 sonrası ikinci en yüksek seviyesine E19'da ulaşmıştır.

CNP-3 ve reseptürü NPR-B sırasıyla 252 bç ve 201 bç olarak bant vermiştir (Şekil 4.15.-C). CNP-3 mRNA ifadesi ilk olarak E13'te gözlenmiş olup, en yüksek seviyesine E16'da ulaştığı tespit edilmiştir. NPR-B mRNA ifadesinin ise tüm CAM gelişimi boyunca gözlenmesine rağmen en yüksek seviyesine, ligandı olan CNP-3 mRNA ifadesine paralel olarak, E16'da ulaştığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 14. Soldan sağa sırasıyla 100 bç DNA marker. 7., 8., 9., 10., 12., 13., 15., 16., 17., 19., 20. günlerde gen ifadelenmesi A)VEGF-A ve VEGFR-2 RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü B) FGF-2 ve FGFR-2 RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü C) CNP-3 ve NPR-B RT-PCR %1'lik agaroz jel görüntüsü D) VEGF-A ve VEGFR-2 dansitometrik analizi E) FGF-2 ve FGFR-2 dansitometrik analizi F) CNP-3 ve NPR-B dansitometrik analizi

5. TARTIŞMA

Anjiyogenez, çok adımlı oldukça karmaşık bir süreç olarak hem gelişimsel hem de fizyolojik bir öneme sahiptir. Bu doğrultuda yapılan çalışmalar daime anjiyogenezle ilgili moleküllerin ve süreçlerin adım adım açıklanması üzerine yoğunlaşmaktadır. VEGFA-, FGF-2 bu süreçte sıklıkla çalışılan moleküllere örnektir. Son yıllarda, CNP başta olmak üzere natriüretik peptid ailesi üyeleri ve bunların reseptörleri de anjiyogenez çalışmalarında ön plana çıkmaktadır. Yapılan bu tanımlayıcı tez çalışmasında, bilinen anjiyogez faktörleri olan VEGF-A, FGF-2 ve reseseptörlerinin CNP-3 ve reseptörü NPR-B ile olan olası ilişksinin zamansal olarak analizi ve tanımlanması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, tavuk embriyosu koryoallantoik membran modeli kullanılarak, E7-E20 arasında CAM üzerinde görülen anjiyogenez süreci ışık mikroskop ile Hematoksilen-Eozin boyama yapılarak ve yarı ince kesitlerin toluidin mavisi ile boyanmasıyla takip edilmiştir. Ayrıca, E7, E8, E12, E15 ve E20 günleri de geçirimli elektron mikroksop ile incelenmiştir. RT-PCR analizleri ise, E7-E20 arasında (E11, E14, E18 hariç) VEGF-A ve FGF-2 ve reseptörleri olan VEGFR-2 ve FGFR-2 yanı sıra, insan CNP homoloğu olan tavuk CNP-3 ve reseptörü NPR-B'nin mRNA ifade düzeylerinin zamana bağımlı değişimi ile çalışılmıştır.

CAM, ekstraembriyonik membran yapısı ile embriyonun gelişimi sırasında gaz değişimi, iyon taşınımı, allantoyisten suyun geri emilimi ve asit -baz dengesinin kurulumu ile homeostazisin kurulmasını ve devam ettirilmesini sağlar. Bunların çoğu koryonik ve allantoik epitel yapısında ve mezenşimde oluşan kan damarları aracılığıyla gerçekleşmektedir (97). Literatürde CAM gelişimi, koryonik ve allantoik epitel ve bunların esktraembriyonik mezenkim tabakalarının morfolojisi ve moleküler özellikleri dikkate alınarak evrelendirilmiştir (14, 98). Bu evrelendirme kan damarlarının gelişimsel sürecini de kapsayacak şekilde genellikle erken, ileri ve geç aşamalar şeklinde ifade edilmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda, CAM yapısında anjiyogenezi aşamalandırmak için ışık mikroskop analizleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, damarların gelişim düzeyi ve damar duvarının yapısı ve kalınlığı dikkate alınarak çalışmamızda E7-E12 erken, E13-E18 ileri ve E18-E20 anjiyogenezin geç evreleri olarak belirlenmiştir.

E7-E12 arasında daha çok kapiller oluşumlar koryonik epitel içinde veya koryonik epitele komşu şekilde görülürken; anjiyogenezin koryonik epitel ve mezenşim arasında ilerlemesi gözlenmiştir. E13-E18 arasında gözlemlenen başlıca durumlar: mezenşimin kalınlaşması, artan hücre populasyonu ve perivasküler alanda organizasyonun başlaması şeklindedir. Buna bağlı olarak, vasküler sistemin hiyerarşik düzende ilk olarak E7-E12 arasında koryonik epitelde ve ona yakın bölgelerde kapiller şeklinde ve sonrasında arteriyovenöz sistemi oluşturacak şekilde bir organizasyonla ilerlediği görülmüştür. Bu durum literatürde tavuk embriyosunun gelişim süreci ile ilgili olan verilerle uyumludur (67, 98, 99). E18-E20 arasında CAM yapısının inceldiği ve damarlarda heterojen bir dağılımın olduğu görülmüştür. E20'de CAM mezenşim içerisinde hem büyük lümenli ve gelişkin duvar yapısına sahip arterlerin, hem de küçük lümenli ve ince duvar yapısına sahip vasküler yapıların varlığı gözlenmiştir (Bkz Şekil 4.7-C ve -D). Ayrıca, koryon epiteline komşu arterioller ve kapiller gözlenmiştir. Vasküler yapıların bu şekilde farklı büyüklük ve konumlarda düzenlenmesi ve kompleks bir yapıya değişimi, muhtemelen yumurtadan çıkmadan önce civcivin artan oksijen ihtiyacıyla ilişkilendirilmiştir.

VEGF-A, anjiyogenez sürecinde reseptörlerinden biri olan VEGFR-2 aracılığıyla endotel hücre proliferasyonunu, göçünü ve endotel hücre sağkalımınını sağlayarak önemli bir rol oynamaktır (4,5). Bu nedenle CAM vasküler gelişimi ile ilgili çalışmalar VEGF-A üzerinde yoğunlaşmıştır (14). Çalışmamamızda, E7-E9 arasında diğer bir deyişle CAM vasküler gelişiminin erken döneminde gösterilen artan VEGF-A mRNA ifadesi literatürle uyum göstermektedir (14, 74). Bu veriler, E7-E12 arasındaki süreçte, mezenşimde endotel tüplerin varlığını gösteren ışık mikroskop analizlerimizle de desteklenmiştir (Bkz Şekil 4.2-B, Bkz Şekil 4.3, Şekil 4.5-B). Bu aşamalarda, anjiyoblastik hücrelerin, VEGF-A sinyali ile prolifere olan ve vaskülogenez/anjiyogenez süreçlerine katılan endotel hücrelerine farklılaştığı düşünülmüştür. Ayrıca, E7-E12 arasında koryonik epitele yakın olacak şekilde kan damarları oluşumunun koryon ve mezenşim arasında ilerlediği görülmüştür. E7-E12 arasında VEGF-A'ya eşlik eden VEGFR-2 mRNA ifade profili de bu sonuçları desteklemektedir (Bkz Şekil 4.15-A). Bu erken dönem, yeni kan damarlarının oluşumu ve gelişmesi, yani vaskülogenez oluşması ve anjiyogenezin başlaması için uygun zaman olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, E7'de görülen ve özellikle kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan perinükleer bölgede belirgin olan granüllü endoplazmik retikulumu (GER) yapısı, VEGF-A ve FGF-2 sentezini kapsadığı düşünülen protein

sentezi ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, damar oluşumu ve gelişiminde endotel hücre filizlenmesi aracılığıyla gerçekleşen anjiyogenezde VEGF-A ve VEGR-2 arasındaki ilişkinin uyumluluğunu CAM anjiyogenezi için de desteklemektedir. Özellikle, E12'de gözlenen koryonik epitelden tomurcuklanan endotel tüp yapılarının varlığı henüz oluşmaya başlayan kan damarlarını ve bu damarlardan anjiyogenez ile gelişen damarların organizasyonunu işaret etmektedir (Bkz Şekil 4.8-B). E8'de artan kollajen sentezinin endotel hücre göçüne uygun ortam oluşmasıyla ve kan damarlarının filizlenmesiyle ve anjiyogenezin ilerlemesi için mezenşimde uygun ortamın oluşmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, E8'de gözlemlenen sütun benzeri yapılar, bu dönemde literatürde gösterilen (14) ve VEGF-A ile ilişkili olduğu belirtilen intussuseptif anjiyogenez ile de ilişkilendirilebilir. Ancak burada instussuseptif anjiyogenez konusunda daha net bilgiler elde edebilmek için ileri çalışmalara ve seri kesitlerin analizine ihtiyaç duyulmaktadır.

FGF-2, hem erken hem de geç anjiyogenezde rol oynamaktadır ve etkisini VEGF-A gibi diğer anjiyogenik faktörlerin ifadesini kontrol ederek göstermektedir (100, 101). FGF-2'nin bu anjiyogenik etkisi, *in vitro* çalışmalarda CAM modeli kullanılarak da incelenmiştir (15, 74, 75). Çalışmamızda, FGF-2 mRNA ifadesi ilk olarak E7-E9 arasında ve ikinci olarak E16-E20 arasında olmak üzere iki pik düzey göstermiştir (Şekil 4.15-E). FGF-2, endotel hücrelerinin prolifere olduğu, göç ettiği ve anjiyogenez aracılığıyla yeni tübül yapılarını oluşturduğu düşünülen bu günlerde VEGF-A ile birlikte ifade edilmektedir. FGF-2 ve VEGF-A mRNA ifadelerinin, CAM gelişiminin erken aşamalarında birbirleriyle örtüşmekte olduğu gösterilmiştir (Bkz Şekil 4.15-D ve -E). E7-E9 arasında CAM yapısında yeni damarların oluşumunun gözlenmesi, FGF-2'nin bir endotel hücre mitojeni olarak VEGF-A ile sinerjistik etkiler gösterebileceği hipotezini desteklemiştir. Ayrıca FGF-2'nin yalnızca endotelyal hücreler üzerinde mitojenik etkileri yoktur. Fibroblastların çoğalmasını da düzenlediği bilinmektedir. FGF'in fibroblastlar üzerindeki bu etkisinin, E15 ile E17 arasında müsküler arter yapısı gösteren ileri arterlerin duvar yapılarında yer alan düz kas ve bağ doku tabakalarının organizasyonunu açıklayabileceği düşünülmüştür. FGF-2 ve FGFR-2' nin her ikisi de endotel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilmektedir. FGF-2, bu reseptörü aracılığıyla endotel hücreleri üzerindeki etkisini gösterir (102, 103, 104). FGFR-2 mRNA ifadesi, E7-E9 arasında ve E16'da kendi ligandı ile eşzamanlı olacak şekilde gösterilmiştir (Bkz Şekil 11E). Bu gözlem, FGF-

2'nin FGFR-2 ile damar gelişiminin ileri evresinde etki gösterdiği hipotezini güçlendirmiştir.

CNP'nin kardiyovasküler sistemde rolü olduğu bilinmektedir (105, 106, 107, 108). CNP'nin, insan aortik endotel hücrelerinden elde edilen hücre kültüründe ifade edildiği gösterilmiştir (107). Ayrıca CNP reseptörlerinden biri olan NPR-B'nin sadece merkezi sinir sisteminde bulunmadığı; aynı zamanda kan damarlarında da ifade edildiği bulunmuştur (108). Bu nedenle, CNP'nin reseptörü NPR-B aracılığıyla kardiyovasküler bir role sahip olduğu düşünülmektedir (87). Ek olarak, CNP'nin NPR-C yoluyla vasküler fonksiyonu düzenleme, vasküler yeniden modelleme ve anjiyogenezi düzenleme üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir (17). Çalışmamızda, CNP-3'ün ve reseptörü olan NPR-B'nin CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenez sürecindeki mRNA ifade profilini, dolayısıyla süreçteki olası katkısını zamansal açıdan analiz etmek ve tanımlamak amaçlanmıştır.

CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenez sürecinde CNP-3 mRNA ifadesi ilk olarak E13'de görülmüş olup, E16'da pik seviyesine ulaşmıştır (Bkz Şekil 4.15-F). E16'da FGF-2 ve CNP-3'ün eş zamanlı ifade edildiği gözlenmiştir (Bkz Şekil 4.15-E ve -F) . Bu sonuçlar, FGF-2 ve CNP-3'ün, CAM gelişimi ve ileri vasküler organizasyon sürecinde anjiyogenezin ileri ve geç aşamalarında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, E16'da embriyonun artan büyüklüğüne paralel olarak artan oksijenizasyon ihtiyacının da CNP-3 ve FGF-2 ifadesini uyarmış olabileceği yorumlanmıştır. Bu bulguyu desteklemek amacıyla hipoksi ile ilişkilendirilen faktörlerle moleküler analiz çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak çalışmamız, VEGF-A ve FGF-2 tarafından düzenlenen anjiyogenik sinyal yolaklarına paralel olarak, CAM yapısında görülen anjiyogenez sürecinde CNP-3/NPR-B sinyal yolağının da etki mekanizmasını araştırabilecek gelecekteki çalışmaların temelini oluşturmuştur. CAM vasküler gelişimi sırasında CNP-3/NPR-B sinyal yolağının anjiyogenezdeki etki mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla fonksiyonel çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsan CNP molekülünün tavuktaki homoloğu olan CNP-3 ve reseptörü NPR-B'nin, VEGF-A/VEGFR-2 ve FGF-2/FGFR-2 ile anjiyogenezdeki olası rolünün incelendiği bu çalışmada, CNP-3'ün tavuk embriyosu gelişiminin geç evresinde perivasküler alanda bir etkisinin reseptörü olan NPR-B aracılı olabileceği görülmüştür. Literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda, çalışmanın moleküler analizlerinin daha çok örnekle tekrarlanması, ekzojen bir faktör olarak CNP kullanılarak veya ilgili reseptörün inhibisyonu yapılarak planlanacak bir çalışmanın takip edilmesi, anjiyogenezin evrelerinin daha detaylı olarak ortaya konması için önem taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

1- Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels, *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 1097–1103.

2- Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern, *J Exp Zool*, 1989; 251: 224–231.

3- Risau, W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development; in Feinberger, R.N., G.K. Sherer, R. Auerbach (eds): The Development of the Vascular System, *Issues in Biomedicine. Basel Karger* 1991, 14: 58–68.

4- Conway EM , Collen D, Peter C. Molecular mechanisms of blood vessel growth, *Cardiovascular Research*, 2001, 49: 507–521.

5- Naito H, Iba T, Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells, *Int Immunol*, 2020, 32: 295-305.

6- Giles JJ, Bannigan JG. The effects of lithium on vascular development in the chick area vasculosa, *J Anat*, 1999; 194: 197-205.

7- Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling, *J Neurooncol*, 2000, 50: 1-15.

8- Tufan A.C., Satıroglu-Tufan N.L. The effect of ethanol exposure on extraembryonic vascular development in the chick area vasculosa, *Cells Tissues Organs*, 2003; 175:85-97

9- Risau W. Mechanism of angiogenesis, *Nature*, 1997, 386: 671-4.

10- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis, *Nat Med*, 2000, 6(4): 389-95.

11- Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents, *Curr Cancer Drug Targets*, 2005, 5: 249-66.

12- Merckx G., Tay H., Monaca ML., Zandvoort Mv., Spiegelaere WD., Lambrichts I. Bronckaers A. Chorioallantoic Membrane Assay as Model for Angiogenesis in Tissue Engineering: Focus on Stem Cells. *Tissue Eng Part B Rev.,* doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0048., 2020

13- Nowak-Sliwinska P., Segura T., Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering, *Angiogenesis*, 17(4): 779–804., 2014.

14- Baum O, Suter F, Gerber B, et al. VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane, *Microcirculation* 2010, 17: 447–457.

15- Ribatti D, Presta M. The role of fibroblast growth factor-2 in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane, *J. Cell Mol. Med.* 2002, 6: 439-446.

16- Ergin C, Tufan AC, Yılmaz C. Bartonella Henselae tarafından uyarılan anjiogenezin, in vivo model olarak yumurta açığında, kabuksuz tavuk embriyosu kültürü üzerinde, koryoallantoik membranda gösterilmesi, *Nobel Med* 2012, 8: 108-112.

17- Bubb KJ., Aubdool AA., Moyes AJ., Lewis S., Drayton JP., Tang O., Mehta V., Zachary IC., Abraham DJ., Tsui J., Hobbs AJ. Endothelial c-type natriuretic peptide ıs a critical regulator of angiogenesis and vascular remodeling, *Circulation,* 2019, 26;139(13):1612-1628.

18- Udan RS, Culver JC, Dickinson ME. Understanding vascular development, *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2013, 2(3):327-346.

19- Mazurek R, Dave JM, Chandran RR, Misra A, Sheikh AQ, Greif DM. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease, *Adv Pharmacol*, 2017, 78:323-350.

20- Naito H, Iba T, Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells, *Int Immunol*, 2020, 32(5):295-305.

21- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature*, 1995, 6;376(6535):62-6.

22- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature*, 1996, 4;380(6573):435-9.

23- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, 6;376(6535):66-70.

24- Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *Am J Pathol*, 2004, 164(5):1531-5.

25- Greif DM, Kumar M, Lighthouse JK, Hum J, An A, Ding L, Red-Horse K, Espinoza FH, Olson L, Offermanns S, Krasnow MA. Radial construction of an arterial wall. *Dev Cell*, 2012, 11;23(3):482-93.

26- Wolinsky H, Glagov S. A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals, Circ Res, 1967, 20(1):99-111.

27- Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473(7347):298-307.

28- Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 2008, 73(7):751-762.

29- Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis*, 2008, 11(1):3-10.

30- De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(5):639-649.

31- Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(1):a006569.

32- Chen W, Xia P, Wang H, et al. The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J Cell Commun Signal*, 2019,13(3):291-301.

33- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S, Gerhardt H. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(10):943-53.

34- Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 2007, 15;445(7129):776-80.

35- Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, 2013, 26(5):441-454.

36- Ando J, Yamamoto K. Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress, *Circ J*, 2009, (11):1983-1992.

37- Mentzer SJ, Konerding MA. Intussusceptive angiogenesis: expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*, 2014, 17(3):499-509. doi:10.1007/s10456-014-9428-3

38- De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, Djonov V, Cornillie P. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis, *J Vasc Res*, 2012, 49(5):390-404.

39- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis?, *Cell*, 1996, 87(7):1153-1155.

40- Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments, *Br J Ophthalmol*, 2006, 90(12):1542-1547.

41- Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells, *Trends Mol Med*, 2004, 10(4):143-145.

42- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, Nature, 2000, 407(6801):242-248.

43- Breier G, Risau W. The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation, *Trends Cell Biol*, 1996, 6(12):454-456.

44- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med*, 2003, 9(6):669-676. doi:10.1038/nm0603-669

45- Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships, *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(5):601-615.

46- Connolly DT, Stoddard BL, Harakas NK, Feder J. Human fibroblast-derived growth factor is a mitogen and chemoattractant for endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 144(2):705-712.

47- Joseph-Silverstein J, Rifkin DB. Endothelial cell growth factors and the vessel wall, *Semin Thromb Hemost*, 1987, 13(4):504-513.

48- Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis, *Annu Rev Physiol*, 1991, 53:217-239.

49- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance, *Science*, 1997, 277(5322):48-50.

50- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF), *J Cell Mol Med*, 2005, 9(4):777-794.

51- Campinho P, Vilfan A, Vermot J. Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior, *Front Physiol*, 2020, (11):552.

52- Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro, *Circ Res*, 2006, 98(1):25-35.

53- Affara M, Dunmore B, Savoie C, Imoto S, Tamada Y, Araki H, Charnock-Jones DS, Miyano S, Print C. Understanding endothelial cell apoptosis: what can the transcriptome, glycome and proteome reveal?, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007, 29;362(1484):1469-87.

54- Yu J, Tian S, Metheny-Barlow L, Chew LJ, Hayes AJ, Pan H, Yu GL, Li LY. Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor, *Circ Res*, 2001, 7;89(12):1161-7.

55- Dünya Sağlık Örgütü. Ölüm İstatistikleri. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. 27 Nisan 2021.

56- Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm İstatistikleri. https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019

57- Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia, *Cell Physiol Biochem*, 2006, 17(5-6); 279-90.

58- Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine model of hindlimb ischemia, *J Vis Exp*, 2009, (23): 1035.

59- Brenes RA, Jadlowiec CC, Bear M, Hashim P, Protack CD, Li X, L W, Collins MJ, Dardik A. Towards a mouse model of hind limb ischemia to test therapeutic angiogenesis, *J Vasc Surg*, 2012, 56 (6);1669-79.

60- Patrycja NS, Tatiana S, M. Luisa IA. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering, *Angiogenesis*, 2014, 17: 779-804.

61- Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NF, Wheatley DN. An in vitro model of angiogenesis: basic features, Angiogenesis, 1999, 3(4):335-44.

62- Verbridge SS, Chakrabarti A, DelNero P, Kwee B, Varner JD, Stroock AD, Fischbach C. Physicochemical regulation of endothelial sprouting in a 3D microfluidic angiogenesis model, *J Biomed Mater Res A,* 2013, 101(10):2948-56.

63- Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on anti-angiogenesis, *Curr Pharm Biotechnol*, 2000, 1(1):73-82.

64- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, Hua J, Löfqvist C, Hellström A, Smith LE. The mouse retina as an angiogenesis model, *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 2010, 51(6):2813-26.

65- Folkman J. Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery, *Perspect Biol Med*, 1985, 29(1):10-36. doi:10.1353/pbm.1985.0049

66- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo 1951, *Dev Dyn*, 1992, 195(4):231-272.

67- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model, *Mechanisms of Development,* 2016, 141: 70–77.

68- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay, *Reprod Toxicol*. 2017, 70:97-101.

69- Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis, Curr. Drug Targets-Cardiovasc. Haematol. *Disord*, 2003, 3:155-185.

70- Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo, *Anat Rec*, 2001, 1;264(4):317-24.

71- Schlatter P, König MF, Karlsson LM, Burri PH. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo, *Microvasc Res*. 1997, 54(1):65-73.

72- Kurz H, Ambrosy S, Wilting J, Marmé D, Christ B. Proliferation pattern of capillary endothelial cells in chorioallantoic membrane development indicates local growth control, which is counteracted by vascular endothelial growth factor application, *Dev Dyn*, 1995, 203(2):174-186.

73- Shumko JZ, Defouw DO, Feinberg RN. Vascular histodifferentiation in the chick chorioallantoic membrane: a morphometric study, *Anat Rec*, 1988;220(2):179-189.

74- Marinaccio C, Nico B, Ribatti D. Differential expression of angiogenic and anti-angiogenic molecules in the chick embryo chorioallantoic membrane and selected organs during embryonic development, Int J Dev Biol, 2013, 57: 907-16.

75- Ribatti D, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, Presta M. Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane, *Dev Biol*, 1995, 170(1):39-49.

76- Ribatti D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model, *Methods Mol Biol*, 2012, 843:47-57.

77- Lee, CYW & Burnett, JC. ANP, BNP and CNP: Physiology and Pharmacology of the Cardiorenal Axis. in *Textbook of Nephro-Endocrinology*. Elsevier Inc., 2009:287-307.

78- Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides, *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50(25):2357-2368.

79- Serkant Unal M, Cevik Tufan A. Mesenchymal Stem Cells and C-type Natriuretic Peptide Signaling: A Proposal for a New Treatment Approach for Skeletal Dysplasias, *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(6):513-521.

80- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats, *Life Sci*, 1981, 5;28(1):89-94.

81- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions, *Endocr Rev*, 2006, 27(1):47-72.

82- Lee, C.Y.W., Burnett, J.C. Natriuretic peptides and therapeutic applications, *Heart Fail Rev,* 2007, 12: 131

83- Olney RC. C-type natriuretic peptide in growth: a new paradigm, *Growth Horm IGF Res*, 2006, 16.

84- Korostyshevskaya, I.M., Maksimov, V.F. & Rudenko, N.S. C-Type Natriuretic Peptide: What, Where and Why?, *Neurosci Behav Physi*, 2016, 46:888–894

85- Cantu SM, Donoso AS, Koyoumdzian NM, Mikusiz NLR, Puyo AM, Choi MR. Clinical Aspects of C-Type Natriuretic Peptide on the Cardiovascular System, *Int J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 1(2):031-036.

86- Špiranec K, Chen W, Werner F, Nikolaev VO, Naruke T, Koch F, Werner A, Eder-Negrin P, Diéguez-Hurtado R, Adams RH, Baba HA, Schmidt H, Schuh K, Skryabin BV, Movahedi K, Schweda F, Kuhn M. Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure, *Circulation,* 2018, 31;138(5):494-508.

87- Pedram A, Razandi M, Levin ER. Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis, *Endocrinology*, 2001, 142(4):1578-1586.

88- Almeida SA, Cardoso CC, Orellano LA, Reis AM, Barcelos LS, Andrade SP. Natriuretic peptide clearance receptor ligand (C-ANP4-23) attenuates angiogenesis in a murine sponge implant model, Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014, 41(9):691-7.

89- Moyes AJ, Hobbs AJ. C-type Natriuretic Peptide: A Multifaceted Paracrine Regulator in the Heart and Vasculature, *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2281. Published 2019 May 8. doi:10.3390/ijms20092281

90- Furuya M, Aisaka K, Miyazaki T, Honbou N, Kawashima K, Ohno T, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury, *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 28;193(1):248-53.

91- Khambata RS, Panayiotou CM, Hobbs AJ. Natriuretic peptide receptor-3 underpins the disparate regulation of endothelial and vascular smooth muscle cell proliferation by C-type natriuretic peptide, *Br J Pharmacol*, 2011, 164(2b):584-597.

92- Umaru B, Pyriochou A, Kotsikoris V, et al. ATP-sensitive potassium channel activation induces angiogenesis in vitro and in vivo, J Pharmacol Exp Ther, 2015, 354: 79-87.

93- Woodard GE, Rosado JA, Brown J. Expression and control of C-type natriuretic peptide in rat vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 282(1):R156-R165.

94- Alan T, Tufan AC. C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions, *J Cell Biochem*, 2008, 105(1):227-235.

95- Houweling AC, Somi S, Massink MP, et al. Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of cnp-3 in chicken, *Dev Dyn*, 2005, 233: 1076–1082.

96- Kocamaz E, Gok D, Cetinkaya A, et al. Implication of c-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF-β1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells, J Mol Histol, 2012, 43: 497-508.

97- Gabrielli MG, Accili D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development, *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010:940741.

98- Makanya AN, Dimova I, Koller T, et al. Dynamics of the developing chick chorioallantoic membrane assessed by stereology, allometry, immunohistochemistry and molecular analysis, PLoS One, 2016; 5: e0152821.

99- DeFouw DO, RizzoVJ, Steinfeld R, et al. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis, *Microvasc. Res*, 1989, 38: 136-147.

100- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16: 159-78.

101- Kano MR, Morishita Y, Iwata C, et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFR-beta signaling, *J Cell Sci*, 2005,118: 3759-68.

102- Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development, *Trends Mol Med*, 2002; 8: 483-9.

103- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, 1997,18: 26-45

104- Yang X, Liaw L, Prudovsky I, et al. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep*, 2015, 17: 509.

105- Lumsden NG, Khambata RS, Hobbs AJ. c-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target, *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 4080-8.

106- 27. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide c receptor signaling in the heart and vasculature, *J Physiol*, 2008, 586: 353–366.

107- Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, et al. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma, *Am J Physiol*, 1992, 263: H1318-21.

108- Suga S, Nakao K, Itoh H, et al. Endothelial production of c-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system", *J Clin Invest*, 1992, 90: 1145-9.