



TC

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

**FARE SEREBROVASKÜLER GELİŞİM MODELİ :
RETİNAL DAMARLANMANIN GEN ANALİZİ**

Dr. KORAY ÖZDUMAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. TÜRKER KILIÇ

İSTANBUL, 2004

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GENEL BİLGİLER	5
3.1. Vaskülogenez ve anjiyogenez.....	5
3.1.1. Vaskülogenez.....	5
3.1.2. Anjiyogenez.....	6
3.2. Serebrovasküler gelişim.....	16
3.3. Retinal gelişim ve damarlanma.....	17
3.3.1. Histolojik değişiklikler	17
3.3.2. Gelişim teorileri	20
3.4. Serebrovasküler gelişim modeli olarak retina	22
3.5. Model hayvanı olarak C57b faresi.....	22
3.6. Hipotez.....	22
3.7. Proje dizaynı	23
3.8. Deneyin geliştirilme potansiyeli ve kullanım alanları	24
4. GEREÇ VE YÖNTEM	24
4.1. Denek hayvanları	24
4.2. Retina izolasyonu.....	25
4.3. Retinadan RNA izolasyonu	25
4.4. RNA saflık kontrolü.....	25
4.5. Array sistemi.....	26
4.6. Görüntülerin ve bulguların işlenmesi	26
5. BULGULAR.....	28
5.1. VEGF ailesi.....	28
5.2. Angiopietinler	30
5.3. PDGF ailesi.....	31
5.4. TGF-beta ailesi	32
5.5. FGF ailesi.....	34
5.6. EGF/TGF- α ailesi	35
5.7. Ephrin ailesi	35
5.8. Ekstraselüler matriks.....	36
6. TARTIŞMA.....	39
7. SONUÇ.....	44
8. KAYNAKLAR.....	53
9. ÖZGEÇMİŞ	59
10. ETİK KURUL RAPORU	65

KISALTMALAR

ALK	Aktivin reseptörüne benzer kinaz
Ang	“Angiopoietin”
AVM	Arteriyovenöz malformasyon
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
bHLH	Bazik “helix-loop helix” transkripsiyon faktörü
EC	Vasküler endotel hücresi
ECM	Ekstraselüler matriks
EGF	Epitelial Büyüme faktörü
BFGF	Fibroblast büyüme faktörü
cDNA	Komplementer DNA
CHGA	“Chromogranin”
COX	Prostaglandin endoperoksit sentaz enzimi
DNA	Deoksiribonükleik asit
Efn	“Ephrin”
FIGF	C-fos tarafından indüklenen büyüme faktörü; diğer ismi VEGF-D
flk	Fetal karaciğer kinazı; rodent VEGFR2 reseptörü; bakınız KDR
flt	Fms’ye benzer tirozin kinaz reseptörü; VEGFR1 reseptörü
fn-1	Fibronektin
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
HHT	Hereditör hemorajik telenjektazi (hastalığı)
HIF	Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörü
ID-1	“DNA bağlanışının inhibitörü”, transkripsiyon faktör inhibitörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL1-RL1	İnterlökin-1 reseptörüne benzeyen
Kavernom	Kavernöz malformasyon
KDR	Kinaz yerleşim bölgesi reseptörü; insan VEGFR2 reseptörü; bkz: FLK
MMP	Matriks metalloproteinaz
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz enzimi
Nrp	“Neurophilin”
PAI	Plazminojen aktivatör inhibitörü
PBS	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
PC	Perisit hücresi
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
RNA	Ribonükleik asit
VEGF	Vasküler endotel büyüme faktörü
SMAD	C. Elegans SMA/Drosophila MAD homologu; ikincil haberci
SMC	Vasküler düz kas hücresi
SSS	Santral sinir sistemi
TGF	Transforme eden büyüme faktörü
THSP	“Thrombospondin”
tie	Tunika intima endotel hücre kinaz reseptörü; diğer ismi ile TEK
TNF	Tümör nekroz faktörü

1. ÖZET

Serebrovasküler gelişim konusunda güncel bilgimiz, bu karmaşık süreci detayları ile açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu alanda kullanılabilir *in-vivo* deney modellerine ihtiyaç vardır. Neonatal retinal doku serebral doku ile histolojik olarak benzerlikler gösterir. Retinal damar gelişiminin de serebrovasküler gelişime benzediğini gösteren kanıtlar vardır. Bu çalışmanın amacı, neonatal fare retinasının bir serebrovasküler gelişim modeli olarak uygunluğunu sınamak ve gen analizini yaparak bu gelişim sırasında oluşan değişimleri belirlemektir.

Model hayvanı olarak C57b faresi kullanılmış, postnatal 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20. günlerde ve 6. haftada izole edilen retinalarda gen ekspresyonu "Superarray Mouse Angiogenesis" yolak spesifik "array kit"i kullanılarak incelenmiş ve retinal gelişim boyunca olan değişiklikler açısından analiz edilmiştir.

Model gen ekspresyonları açısından incelendiğinde, neonatal retinal gelişim sırasında, 8, 10, 12, 16 ve 20. günlerde anjiyogenezde rol alan faktörlerde belirgin değişiklikler görülmüştür.

Neonatal fare retinası serebrovasküler gelişimi incelemek için uygun ve pratik bir modeldir. Neonatal retinada, gen ekspresyonunda gözlemlenen belirgin değişiklikler içinde, 10. gündekiler anjiyogenezin başlangıç basamağındakilerle, 16. gündekiler anjiyogenezin sonlanma basamağında olan değişikliklerle benzeşmektedir. Bu bulgular, derin retinal vasküler pleksusun anjiyogenez ile oluştuğu savını desteklemektedir. Yüzeyel vasküler pleksus oluşumu hipoksi ve VEGF ekspresyonundan bağımsız bir mekanizma ile olur. Bunun vaskülogenez ile olduğunu kanıtlamak için yeni kanıtlara ihtiyaç vardır. Bu bulgular halen geçerli olan serebrovasküler gelişim teorileri ile uyumludur.

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Fare, anjiyogenez, retina, serebrovasküler malformasyon

2. SUMMARY

Our current knowledge on cerebrovascular development falls short of describing this complicated process in detail. In-vivo experimental models are needed. The neonatal retina resembles the cerebral tissue in many respects. It has also been shown that the retinal development is similar to the cerebrovascular development. This project aims to evaluate the neonatal mouse retina as a model for cerebrovascular development, and perform an analysis of genes involved in angiogenesis to define temporal changes in expression.

The C57b mouse was used and retinas were isolated at postnatal days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 and at 6 weeks. Gene expressions were determined using the “Superarray Mouse Angiogenesis” pathway specific array kit and analyzed for changes throughout the extent of retinal development.

Upon analysis for changes in angiogenetic gene expression major changes in gene expression were noted at 8, 10, 12, 16 and 20 days.

The neonatal mouse retina is a suitable and easy model to study cerebrovascular development. Angiogenetic gene expression changes at the 10th day are similar to changes known to occur at the initiation step of angiogenesis. Changes noted at the 16th day are similar to the processes of the resolution step of angiogenesis. This data supports the notion that the deep vascular plexus develops via angiogenesis. At the same time it is noted that the superficial vascular plexus develops on a hypoxia and VEGF independent process. However further evidence is needed to characterize this process as vasculogenesis. These findings are compatible with current theories of cerebrovascular development.

KEYWORDS

Mouse, angiogenesis, retina, cerebrovascular malformation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Serebrovasküler malformasyonların patogenezi günümüzde detayları ile ortaya konmamıştır. Bu konudaki çalışma sayısı azdır. Yapılmış olan ilk çalışmalar, tanımlayıcı anatomik-patolojik incelemeler olmuştur (54). Her ne kadar bu çalışmalar serebrovasküler patolojiler konusunda bize yoğun bilgi sağlasa da, bu bilgi statik bir betimlemeden ileri gidememektedir. Oysa günümüzde kabul gören kanı, serebrovasküler malformasyonların statik patolojiler olmadıkları (ve çevre ortamdaki değişikliklerden de etkilenen) dinamik bir yapıya sahip olduklarıdır (4, 93). Temporal değişim konusundaki bilginin yokluğu ve eksojen faktörlerin (hemodinamik stres vb.) geçmişteki ya da süregelen etkilerinin, patolojiye özgün fenotipik bulgulardan ayırt edilememesi, patolojik anatomik çalışmaların vasküler malformasyonların patogeneziyi aydınlatmakta yetersiz kalmasına yol açmaktadır.

Temporo-spasyal (zaman ve 3. boyut) olarak da bilgi verebilecek (doğal ortamında çevre ile etkileşim içinde yaşayan) bir serebrovasküler malformasyon modelinin gerekliliği tartışmasızdır. Bu konuda ilk akla gelen deney modeli hücre kültürleridir. Fakat arteriyovenöz malformasyonlar ve kavernomlardan spesifik endotel kültürleri yapılmış olmasına rağmen, teknik olarak zordurlar ve geçerlilikleri tartışmalıdır (3, 60, 89). Üstelik, endotel kültürü çevre destek doku içinde yaşayan endoteli taklit etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu, serebrovasküler malformasyonların incelenmesinde, in-vivo hayvan deneylerini tek seçenek kılar. Hayvan deney modellerinin bu konudaki geçerliliği ise genel kabul görmektedir (45). Örnek olarak, nadir ailesel arteriyovenöz malformasyon sendromlarından Hereditör Hemorajik Telenjiektazi (HHT) patogenezi konusundaki bulgular hayvan deneylerine aktarılmıştır. Hastalıkla ilgili olduğu düşünülen endoglin ve ALK-1 isimli genlerin, C57b faresindeki “knock-out” modellerinin yapılması ve bu modellerde fenotipik olarak arteriyovenöz malformasyonların gösterilmesi, bu konuda hayvan modellerinin insan hastalığını modellemekteki yeterliği konusunda bir göstergedir (79).

Fare retinası serebrovasküler gelişimi taklit etmek için bir deney modeli olabilir (5, 48). Retina, diensefalonun bir uzantısı olarak gelişir ve santral sinir sisteminin bir parçasıdır

(47, 48). Serebrovasküler yapıya benzer şekilde nöronlar, astrositler, kan damarları içerir ve kan-beyin bariyerine benzer bir kan-retina bariyeri oluşturur. Dolayısı ile serebral doku ile histolojik benzerlikler gösterdiği için retina bir serebrovasküler deney modeli olabilir. Rodent retinası ise bu modeli daha çekici kılacak özellikler içerir.

Bunlar:

- Rodent retinasının doğum sırasında avasküler oluşu (19, 21, 35, 66, 92),
- Damar gelişiminin tümünün doğum sonrası olması (19, 21, 35, 66, 92),
- Retinal damarlanmanın 20 gün gibi kısıtlı bir zaman dönemi içinde gerçekleşmesi (19, 21, 35, 66, 92),
- Damar gelişim safhalarının zamansal ve 3 boyutlu olarak ayrılabilmesi (19, 35, 66, 92),
- İki boyutlu yapısı ve yerleşimi nedeniyle direk gözleme açık olması (19, 35, 66, 92),
- İnce laminer yapısı nedeniyle tam kat preparasyonlarla in-situ mikroskopiye imkan tanınması (21, 48, 66),
- Daha önce bu model kullanılarak serebrovasküler malformasyonların ve bunların görüldüğü hastalıkların oluşturulmuş olması (8, 9, 79),
- Rodent modellerinin müdahaleye açık (farmakolojik/moleküler biyolojik) olmalarıdır (66).

Serebrovasküler malformasyonların fizyopatolojisini anlamak için pratik bir yol (daha önce de belirtildiği gibi), bu patolojilerin gelişimini normal damar gelişimi ile karşılaştırmaktır. Gelişimi incelemek için, normal damar gelişiminden sorumlu olan süreçlerin detayları ile ortaya konmuş olması gereklidir.

Bu çalışmanın amacı, fare retinal damar gelişimini serebrovasküler gelişim modeli olarak kullanmak üzere, bu süreç sırasında anjiyogenezle ilgili faktörlerin zamansal değişimini detayları ile ortaya koymaktır. Bu, ileride yapılacak çalışmalar için referans değerlerini belirleyecektir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, farklı türlerde retinal gelişimi kaba hatları ile ortaya koymuş ve bu gelişimdeki global gen ekspresyonunu irdelemiştir (19, 24, 25, 35, 65, 92). Fakat nöral retinadaki vaskülogenez konusunda detaylı çalışma yapılmamıştır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. Vaskülogenez ve anjiyogenez

Damar gelişimi üç süreçle olur (15, 93). Bunlar kök hücrelerinden primitif vasküler ağın gelişmesi ile karakterize olan *vaskülogenez*, gelişmiş olan ağdan (tomurcuklanma, bölünme, intussusepsiyon ile) yeni damar oluşumunu sağlayan *anjiyogenez* ve varolan damarlardan daha geniş çaplı kollaterallerin gelişimini sağlayan *arteriyogenezdir* (15, 93). Bu üç süreçte rol alan faktörlerin büyük bir kısmı ortaya konmuş ve detaylı şekilde incelenmiştir (15).

Embriyoda vasküler yapının mezenkimal hücrelerden *de-novo* oluşumu vaskülogenez olarak bilinir (15). Bu mezodermden köken alan anjiyoblastlardan ilk primitif damarların oluşması ile karakterizedir. Vaskülogenezden farklı olarak anjiyogenez sürecinde var olan damarlardan tomurcuklanma ile yeni damar ağları oluşur. Her iki süreç birçok konuda benzerlikler ve hatta ortaklıklar gösterir. Yakın zamandaki yaklaşım ise her üç damar gelişimi sürecinin bir ortak bütün olduklarıdır (43). Vaskülogenez ağırlıklı olarak embriyoda olur (15, 43). Fakat erişkin sıçanda kemik iliği kökenli kök hücrelerin koroid pleksus vasküler yapısına katılması ve insanda periferik kanda kemik iliği kaynaklı endotel kök hücrelerinin varlığı bu sürecin erişkinde de mümkün olduğunu göstermiştir (2, 94).

Damar oluşumu ve yeni damar ağının şekillenmesi (remodelling) parakrin sinyaller (A), interselüler kontaklar (B), hücrelerarası adezyon molekülleri (C) ve ekstraselüler matriks (D) ile iletilen sinyallerce düzenlenen karmaşık bir süreçtir (4).

3.1.1. Vaskülogenez

Vasküler ve hematopoetik sistem hücreleri embriyoda ortak öncü hücre olan hemanjiyoblasttan kaynaklanır. Hemanjiyoblastlar vitellus kesesinde hücre birikimleri oluştururlar. Bu birikimlerin iç kısmındaki hücreler hematopoetik kök hücrelerine, dıştaki hücreler ise endotel hücrelerine farklılaşırlar. Oluşan anjiyoblast embriyoda migrasyonla dağılır. *In-situ* gelişim sonrasında ise vasküler pleksus oluşur. VEGFR-

2(KDR/Flk-1) ve bFGF anjiyoplast farklılaşmasını indüklerler. VEGFR-1(Flt-1) ise bunu baskılar. TGF- β yolağının da vaskülogenezde rolünün olduğu bilinmektedir fakat bu yolun detayları gösterilememiştir. Büyüme faktörleri haricinde ekstraselüler matriks makro-molekülleri, Fibronektin ve İntegrinler (özellikle İntegrin α - β 3) vaskülogenezi kontrol ederler.

Anjiyogenezdeki aksine vaskülogenezdeki VEGF salınımı hipoksi bağımlı değildir (10). Endotel hücrelerinin anjiyogenetik özelliklerini eksprese etmeleri ise ETS-1, Hex, Vezf-1, Hox, GATA ve bHLH transkripsiyon faktör aileleri tarafından kontrol edilir (15).

Endotel hücrelerinin arter ya da venöz karaktere dönüşmeleri ise anjiyoplast aşamasında bHLH (Basic Helix-Loop Helix) transkripsiyon faktörleri ve bunların üzerine etkisi olan ephrin ailesince kontrol edilir (4).

3.1.2. Anjiyogenez

Anjiyogenez erişkinde ve embriyonun geç dönemlerinde başlıca damar oluşum mekanizmasıdır (15, 93). Erişkinde vaskülogenez ve arteriogenez de görülür fakat geri plandadır(15, 93). Erişkinde anjiyogenez yara iyileşmesi, dişi reproduktif döngüsü gibi süreçler sırasında fizyolojik olarak ortaya çıkabildiği gibi tümör büyümesi, romatoid artrit, diabetes mellitus ve kardiovasküler hastalıklar gibi patolojik süreçlerde de rol alır (15, 93).

Anjiyogenez sürecini anlatımı basitleştirmek amaçlı olarak, iki safhada incelemek mümkündür (15, 93). Anjiyogenetik uyarana cevap olarak damar destabilizasyonu, matriks yıkılması, endotel hücre (EC) çoğalması, göçü ve damarsal tüp oluşumunu içeren olaylar dizisi “**anjiyogenezin başlangıç basamağı**” olarak isimlendirilir (15, 93). Buna karşılık mezenkimal hücre çoğalması, göçü, vasküler düz kas hücresi (SMC)ve Perisit (PC) farklılaşması, EC-SMC/PC karşılıklı etkileşimi, ekstraselüler matriksin olgunlaşmasından oluşan olaylar dizisi ise “**anjiyogenezin sonlanma basamağı**” adı altında sınıflanabilir (15, 93) (tablo1).

Talol1: Anjiyogenez basamakları

Basamak	Olay	Detay	Rol alan faktörler
Aktivasyon basamağı	Anjiyogenetik stimulus	Hipoksi, yaralanma, mitojenik faktörler (tümör)	VEGF, NO
	Damar destabilizasyonu, permeabilite artışı kemotaksis	Vazodilatasyon, permeabilite artışı, kemotaksis	VEGF, Angiopoietin-2, PECAM, VE-cadherin, İntegrinler
	Matriks degradasyonu	İlk 2 süreçle eşzamanlı olarak başlar	MMP, U-PA
	EC proliferasyonu		VEGF, Ang2, TGF-β
	EC migrasyonu		VEGF, Ang2, TGF-β
	tüp formasyonu		VEGF, Ang-1
Sonlanma basamağı	EC stabilizasyonu	Çoğalma ve göç durur, Bazal membran tekrar yapılır	Ang-1
	Mezenkimal proliferasyon/migrasyon		PDGF-BB, PDGF-β, BFGF, HGF
	SMC/PC farklılaşması		PDGF-BB, PDGF-β, BFGF, HGF
	EC- SMC/PC etkileşimi		VE Cadherin

Bu basamakları daha detaylı ele alacak olursak başlangıç basamağı nitrik oksit bağımlı vazodilatasyon ile başlar. Nitrik oksidin bir görevi de VEGF ailesi büyüme faktörlerinin ekspresyonunu arttırmaktır. Vazodilatasyonun ardından vasküler geçirgenliğin VEGF tarafından artırılması endotel hücre çoğalması ve göçünü destekleyecek bir ortam yaratır. Eşzamanlı olarak matriks metalloproteinazları (MMP) bazal lamina ve ekstraselüler matriksi parçalarlar.

Endotel hücreleri ve perisitler bu alana göçerler. Endotel hücre birikimleri aralarında tüp yapıları oluşturur ve bu yapılar da birleşerek yeni bir vasküler ağ oluştururlar.

Sonlanma basamağında ise hücre çoğalması durur, bazal membran tekrar oluşur. Damar tüpü yapısına perisitler katılır ve perivasküler destek hücreleri tarafından çevrelenir. Damar olgunlaşması ve stabilizasyonu olmadığı takdirde bu primitif damar ağı gerileyecektir. Damar ağının gerilemesi retinada apoptoz mekanizması ile gerçekleşir (15).

Anjiyogenezin başlangıç basamağında rol alan büyüme faktörleri

VEGF yolağı

VEGF ilk olarak damar permeabilitesini arttıran bir faktör olarak hepatoselüler karsinomlu deney hayvanlarını asit sıvısından izole edilmiş ve kısa süre içinde anjiyogenetik potansiyeli fark edilmiştir (56). Memelilerde VEGF ailesine ait 5 tip ligand tarif edilmiştir. Bunlar VEGF-A-E ve PlGF'dir (36, 43, 93). Polioma virüste bir reseptör daha tarif edilmiş fakat bunun memelilerdeki karşılığı daha gösterilememiştir (43).

VEGF-A ya da daha sık kullanılan ismi ile VEGF 40-45 kDa ağırlığında homo-dimerik bir proteindir (4, 43, 93). 6p21.3 lokalizasyonlu ve 8 ekson içeren tek bir genden, "alternate splicing" yolu ile sentezlenir (43, 93). Bunun sonucunda 121, 145, 165, 189 ve 206 amino asitlik 5 farklı izoform oluşur (43, 93). İzofomlar arasında 121 ve 165 en sık olarak görülenleridir (43). Biyolojik etkiler açısından alt tipler arasında küçük farklar olduğu düşünülmektedir (43).

VEGF fizyolojik ya da mitojenik stimuluslarla salgılanabilir (43, 93). Fizyolojik olarak VEGF ekspresyonunu sağlayan hipoksidir. Hipoksi intraselüler HIF-1alfa (hypoxia inducible factor) üzerinden VEGF ekspresyonunu sağlar. HIF-1alfa hem VEGF geni

ekspresyonunu artırır hem de VEGF m-RNA'sını stabilize ederek translasyonu artırır (15, 43, 93).

VEGF'in bilinen 4 reseptörü bulunur (15, 43). VEGFR-1, -2, ve -3 tek membran geçişli, intraselüler parçalarında tirozin-kinaz aktivitesi taşıyan reseptörlerdir. Bu reseptörler endotel hücreleri ve bunların öncülleri tarafından eksprese edilir. VEGFR-3 (flt-4:fms-like tyrosine receptor-4) diğer VEGF reseptörüdür ve lenfatik sisteme özgündür. Reseptörlerin ligand özgünlükleri tablo 3'de gösterilmiştir. Tirozin kinaz aktivitesine sahip üçüncü bir VEGF reseptörü olan neurophilin-1 VEGFR-2(KDR/Flk-1) molekülü ile VEGF etkileşimini kontrol eder (4, 15, 43, 93).

VEGF endotel hücrelerine özgün bir mitojen ve kemotaktik faktördür (4, 15, 43, 93). VEGF endotel kökenli nitrik oksit sentazı indükleyerek anjiyogenezi başlatır (4, 15, 43, 93). Bazal membran ve ekstraselüler matriksi parçalayacak olan endotel hücresi kaynaklı proteazların salınımını artırır. Ayrıca VEGF vasküler geçirgenliği (vasküler endotel hücresi hasarı, mast hücre degranülasyonu ya da inflamasyon yaratmadan) artırır. Serum proteinlerinin perivasküler ekstraselüler matriks içine sızmasına yol açarak vasküler endotel hücresi migrasyonu için zemin hazırlar (93). Monosit ve nötrofil migrasyonuna yol açar. VEGF anjiyogenez için vazgeçilmezdir (4, 15, 16, 43, 67, 93). VEGF geninin hasarlı olması hayatla bağdaşmaz, VEGF "knock-out" hayvanlar vitellus kesesinde kan adacıklarının oluşumu basamağı öncesi ölümler ve incelenmelerinde endotelin tüp yapıları oluşturamadığı izlenir (16, 33). Fakat VEGF'in etkileri bununla sınırlı değildir, damar devamlılığı için de gereklidir (16, 32).

Embriyolojik gelişimde VEGFR-1(Flt-1) vasküler ve hematopoetik öncü hücre olan hemanjiyoblastta ilk olarak ortaya çıkar ve vitellus kesesi kan adacıklarının oluşumu, dolayısıyla hematopoez ve vaskülogenezin ilk safhaları için hayati önem taşır (23). Endotel hücreleri haricinde mast hücrelerinde de eksprese olur (83) ve VEGF'in pro-inflamatuar etkilerinden sorumludur (36). Flt-1 "knock-out" hayvanlar (flk-1 "knock-out" hayvanlarla karşılaştırıldığında) vaskülogenezin daha ileri aşamalarında ölümler (34). Dolayısı ile flt-1'in vaskülogenezin daha geç basamaklarında etkidiği öne sürülmüştür (36).

VEGFR-2(KDR/Flk-1) selektif olarak endotel hücreleri ve onların öncü hücrelerinde eksprese olur (75), hematopoez ve vaskülogenezde önemli rol oynar (81). Flk-1 endotel

üzerinde mitojenik etki gösterir ve tüp oluşumunu indükler (90). Flk-1 “knock-out” hayvanlar vaskülogenezin erken basamaklarında vitellus kesesinde kan adacıklarının oluşumu öncesi ölürlür (82).

Neurophilin-”knock out” hayvanlardaki bulgulardan anlaşıldığı kadarıyla Neurophilin de embriyoda damar gelişiminde önemli rol alır (53).

VEGF ailesi ve angiopoietinler anjiyogenez için spesifik olan iki sinyal sistemidir (93). Diğer büyüme faktör aileleri anjiyogenez sırasında önemli roller almalarına rağmen anjiyogenez haricinde başka hücrel mekanizmalarda da rol alırlar.

Angiopoietin yolağı

Angiopoietinler endotel spesifik tirozin kinaz reseptörü Tie-2'nin (Tunica intima endothelial cell kinase/TEK) ligandlarıdır (4, 43, 93). Spesifik olarak endotel hücrelerinde eksprese olurlar (93). Varlığı gösterilmiş dört ligand arasında en iyi bilinen ikisi angiopoietin-1(Ang-1) ve angiopoietin-2(Ang-2)'dir (43). Ligandı ve fonksiyonu bilinmeyen Tie-1 reseptörü de endotel hücrelerinde eksprese olur (43).

Angiopoietinler damar olgunlaşması, şekillenmesi ve stabilitesinin korunmasında görev alırlar. Her iki faktör de vasküler endotel hücresi üzerinde mitojenik etki göstermez fakat ang-1 in vivo kültür ortamında endotel dallanmasını indükler (22).

Ang-1 endotel dallanmasını indükler; endotel hücreleri arası bağlantıları kuvvetlendirir ve endotel hücre migrasyonunu inhibe eder (15, 43). Ang-1 aynı zamanda VEGF tarafından oluşturulan damar geçirgenliğindeki artışı da geri döndürür (43). Ang-1 VEGF ile birlikte eksprese olduğunda damar sayısının ve çapının artmasına yol açar (73). Bu şekilde Ang-1 anjiyogenezin sonlanma safhasında damar ağının olgunlaştırıcı etki yapar (1, 4, 15, 36, 43, 73, 93). Ang-1 ya da tie-2 “knock out” hayvanlar erken embriyonik dönemlerde oluşan vasküler anomaliler sonucunda ölürlür. Bu hayvanların incelemesinde vasküler endotel hücresi sayısının azaldığı, dallanmanın basitleştiği, PC ve SMC'lerin damar duvarında bulunmadıkları gözlenir (29). Ang-1 ve Tie-2 erişkin damarlarda da fosforile formuyla bulunur ve damar ağının devamını sağlar (1).

Ang-2 ise Ang-1'in doğal yarışmalı inhibitörüdür, tie-2 reseptörüne bağlanır fakat aktive etmez (61). Ang-2/Tie-2 salgısının arttırıldığı transgenik hayvanlarda (Ang-1 ya

da tie-2 “knock-out” hayvanları taklit edecek şekilde) endotel hücreleri apoptotik yolla regresyona uğrarlar (36). Bu damar devamlılığını sağlayan ang-1 sinyalinin kesilmesine bağlıdır (36). Ang-2 VEGF ile birlikte eksprese olduğu durumlarda damar yapısını destabilize ederek anjiyogenezin başlaması için altyapı oluşturur (73), vasküler endotel hücresi proliferasyon ve migrasyonunu arttırarak anjiyogenezin başlangıç basamağında rol oynar (1, 4, 15, 36, 43, 73, 93).

FGF yolağı

Basic-FGF *in vivo* ve *in-vitro* ortamlarda anjiyogenezin önemli bir stimülatörüdür, fakat vaskülogenezdeki rolü ortaya konmamıştır (15).

TGF-beta yolağı

TGF- β yolağı hem “pro-anjiyogenik” hem de anjiyogenezi inhibe eden etkiler gösterebilir (38, 88). Etkiler aşağıda tartışılacaktır.

Ephrin yolağı

Ephrin ailesi reseptör tirozin kinazlar arasındaki en büyük grubu oluşturur. Bu ailede 8 ligand ve 14 reseptör bilinmektedir. Ephrinler direk indüksiyon değil de diğer yolakların modülasyonu mekanizması ile çalışırlar. Ephrin reseptörleri iki gruptur. Tip-A reseptörleri plazma membranına tutunmuş şekilde çalışır. Buna karşılık Tip-B reseptörleri diğer tirozin kinaz reseptör ailelerinde gördüğümüz şekilde bir transmembran bölgesine ve intraselüler kinaz etkili bölgelere sahip reseptörler yapısındadır.

Vasküler yapının oluşumu konusunda yapılan ilk çalışmalarda birbirinden morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklar gösteren arteriyel ve venöz sistemlerin tek bir kökenden geldiği ve hemodinamik uyarılar sonucunda farklılaştıkları düşünülmüştür. Fakat yeni gözlemler arteriyel ve venöz yapıların damar oluşumunun ilk safhalarından itibaren farklı özellikler gösterdiğini ortaya koymuş ve gelişimin genetik kontrol altında olduğunu göstermiştir (4, 43).

Bir trans-membran reseptörü olan Ephrin-B2 molekülünün anjiyogenezin ilk safhalarından itibaren arterleri oluşturacak olan hücrelerde, Ephrin-B4 molekülünün ise

venöz sisteme ait olan hücrelerde bulunduğu gözlenmiştir (36, 43). Ephrin B4 molekülünün Ephrin-B2'nin reseptörü olduğu bilinmektedir (36, 43). Ephrinlerin etki göstermek için hücre yüzeyine bağlı olmaları gerektiği göz önünde bulundurulursa bu iki molekülün nasıl bir araya geldikleri açıklanamamıştır (36). Ephrin-B2 “knock-out” hayvan modellerinde tüm vasküler sistemde defektler izlenmiştir. Ephrin sinyal sisteminde gösterilen bu farklar vasküler oluşumun genetik kontrol altında olduğu savını da desteklemektedir.

Anjiyogenezin sonlanma basamağında rol alan faktörler

PDGF yolağı

PDGF 30KD ağırlığında A ve B zincirlerinden oluşan homo-/ heterodimerik bir proteindir (43). Tüm dimerler fonksiyoneldir (AA,AB,BB) PDGF dimerleri etkilerini yine dimerik tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak gösterirler (43). Reseptörler alfa ve beta monomerlerinin 3 farklı kombinasyonundan oluşur ($\alpha\alpha / \alpha\beta / \beta\beta$) (4, 43).

PDGF primitif damar ağına destek hücrelerinin katılmasından sorumludur (4). B-ligandı ve beta-reseptörü vasküler gelişim için hayati önem taşırlar. β -reseptör ya da B-ligandını eksprese etmeyen “knock-out” hayvanlar fetal dönemde kanamaya bağlı olarak ölürlür. Bu hayvanların renal damarlarında perisit yoktur (57, 84). Aynı şekilde PDGF-B eksprese etmeyen hayvanların serebral damarlarında mikro-vasküler perisitler görülmez (59). Bu hayvanlar gestasyonun geç dönemlerinde serebral kapillerlerde gelişen mikro-anevrizmaların rüptürü sonucunda ölürlür (59). Anjiyogenezin son basamağı damar matüritesinin çevre destek hücrelerinin katılması ile sağlanmasına dayanır (54a). PDGF- β yolağının çalışmamasının sonuçları bu destek hücreleri olan perisitler (PC) ve damar düz kas hücrelerinin (SMC) eksikliğine, yani damar matüritesinin sağlanamamış olmasına bağlıdır.

TGF-beta yolağı

“Transforming growth factor-beta” (TGF-beta) ailesi dimerik polipeptid bir büyüme faktörlerinden oluşan bir gruptur (43, 86, 88). Bu geniş aile sitozolik kısmında serin-treonin kinaz aktivitesi olan tek geçişli transmembran reseptörleri üzerinden parakrin etkilerini gösterir (43, 86, 88). Reseptörler iki gruptur ve tip-I ve tip-II olarak

isimlendirilir (38, 86, 88). Ligand dimerleri spesifik tip-II reseptörlerine bağlanır ve tip-I reseptörünün fosforile olmasını sağlayarak iki ligand ve iki reseptörden oluşan tetramerler oluşturur. TGF-beta yolağındaki sinyalin nukleusa iletilmesi son derece direktir (38, 88). İleti ikincil haberci sistemi olarak Smad (C. Elegans nematodunda ortaya konan "sma" ve Drosofilada ortaya konan "mad"dan ismini alır) ailesini kullanır (88).

TGF-beta'nın Tip2 transmembran reseptörüne (TBR-II) bağlanması sonrası TGF-beta Tip1 reseptörü (TBR-I ya da ALK-5: Activine receptor like kinase) aktive olur. Bu intraselüler "Smad" ikincil-haberci sistemini etkiler. ALK-5 aktivasyonu sonucunda fosforile olan "Receptor Regulated Smad'lar" (R-Smad: ALK-5 için Smad-2 ve Smad-3) intrasitoplazmik Co-smad'larla (Smad4 olarak da bilinir) birleşerek nukleusa transloke olur. Bu nukleusta hedef genlerdeki "TGF- β -Response Element" transkripsiyonu sağlar. Endotel hücrelerinin (EC) ALK-1 olarak da bilinen ikinci bir TGF-beta Tip1 reseptörü eksprese ettikleri bilinmektedir. Bu reseptör sadece anjiyogenezin aktif olduğu bölgelerde bulunur ve benzer mekanizma ile çalışır. TGF-beta1 ve TGF-beta3 ligandlarını tanıır. TGF-beta bağlanması sonrası TBR-II tarafından aktive edilen ALK-1 hücre içinde bu sefer farklı R-Smad'ları aktifler (ALK-1 için Smad-1 ve Smad-5). Co-Smad'larla birleşme sonrası nükleer etkiler ortaya çıkar.

Her iki yolakta birçok mekanizma ile kontrol edilir. ALK-1 aktivasyonu sonrası nükleer "Liver X Receptor- β " transkripsiyon faktörü fosforile edilir ve kendi yolağını baskılar (feedback inhibisyon). ALK-1 yolağının aktivasyonu aynı zamanda ALK-5 yolağını da baskılar. Herediter hemorajik telenjiektazi (Osler-Weber Rendu) hastalığında bozukluğu gösterilmiş olan "endoglin" intraselüler kinaz bölgesi bulunmayan bir TGF-beta reseptörüdür ve ALK-5 yolağını inhibe ederek etkisini gösterir. Başka yollar da TGF-beta yolağını dışardan etkileyebilirler: Örneğin γ -interferon intraselüler Smad-7 miktarını arttırarak TGF-beta yolağını baskılar.

TGF- β yolağı embriyoda damar oluşumunda ve erişkinde damar bütünlüğünün sağlanması/devamında rol alır (38, 86). TGF- β yolağı anjiyogenezdeki etkileri bakımından en karmaşık yoldur. TGF- β 'nin VEGF salgısını arttırdığı, endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engellediği, ekstraselüler matriks kompozisyonunu değiştirebildiği, apoptozu başlatabildiği in vivo olarak gösterilmiştir (72). Bu birbirine zıt etkilerin nasıl koordine edildikleri konusunda çelişkili yayınlar vardır. Kontrolün

konsantrasyon bağımlı olarak yapıldığını iddia eden yazarlar vardır (38, 39). TGF-beta düşük konsantrasyonlarda pro-anjiyogenik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda anjiyogenezi inhibe eder (38, 39, 88). TGF-beta'nın bu birbirine zıt etkileri kullandığı iki sinyal yolağından kaynaklanıyor olabilir (38, 39, 49, 88).

TGF- β /ALK-5 yolağı nukleusta Plasminogen Activator İnhibitor-1 (PAI-1), Fibronektin ve Thrombospondin-1 (THSP-1) ekspresyonunu arttırarak migrasyon, proliferasyon ve tüp formasyonunu inhibe eder. Bu anjiyogenezin bitiş fazına girmesine yol açar (38, 39, 49, 72, 88). İlginç bir şekilde ALK-5 yolağının aktivasyonu endotel hücrelerinde spesifik olarak vasküler düz kas hücreleri (SMC) ile ilgili genleri aktifler (46). Bu TGF-beta aktivasyonunun endotel hücresi çevresindeki vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşmasını sağladığını düşündürür.

TGF- β /ALK-1 yolağının hedef genleri olarak ise ID-1 (Inhibitor of DNA Binding: Bu bHLH-Basic Helix Loop Helix- Transkripsiyon faktörünün en önemli inhibitörüdür), C-myc ve Interleukin Receptor Like (IL1RL1) bulunmuştur (38, 39, 49, 72, 88). TGF- β /ALK-1 aktivasyonu ayrıca CDK İnhibitor(p21) sistemini de baskılar. Aynı zamanda bu yolağın Thrombospondin-1 (THSP-1) ekspresyonunu baskıladığı da bilinmektedir. C-myc aktivasyonu TGF- β /ALK-1 yolağının endotel hücresi üzerine mitojenik etkide bulunur (38, 39, 49, 72, 88). Id1 aktivasyonu da endotel hücrelerine proliferatif ve invaziv bir karakter kazandırır. Sonuç olarak TGF- β /ALK-1 yolağı pro-anjiyogenik olarak etki ettiği düşünülmektedir.

TGF-beta ekspresyonu erişkinde de devam eder ve bunun damar bütünlüğünün korunmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir.

TGF-beta'nın etkilerinin bu iki farklı mekanizmanın dengesi sayesinde oluştuğu düşünülmektedir fakat şu anki bilgi ışığında hangi yolağın ne zaman çalıştığını söylemek mümkün değildir (38, 49).

Ekstraselüler matriks proteinlerinin rolü

Anjiyogenezin fonksiyonel bir damar ağını oluşturabilmesi tüm sürecin spasiyal ve temporal olarak uyum içinde çalışmasına bağlıdır. Bu uyum dört sistem tarafından sağlanır: Parakrin sinyaller, interselüler bağlantılar, hücre adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks (4). Tüm komponentler bu süreçte aktif rol alır (4, 15, 23b, 54, 54b).

Ekstraselüler matriks *yapıtaşları*, statik olduklarını kabul eden eski inanışın aksine, vaskülogenez ve anjiyogenez ve damar devamlılığında aktif rol alırlar. Tavuk embriyosunda fibronektinin endotel hücre prekürsörleri için yol gösterici olduğu, laminin proteininin ise diferansiasyonu haber verdiği gösterilmiştir (51). Retinal damar gelişiminin optik sinirden başlayarak konsantrik şekilde yayıldığı ve yayılmaya astrositlerin öncü olduğu düşünülmektedir (21, 51). Yine optik sinirden konsantrik olarak yayılan (laminin içeriği ile karakterize) olgun damarlanma bölgesinin önünde ilerleyen bir “gelişim bölgesi” tariflenmiştir (51). Bu bölge içinde iğsi hücreler ve astrositlerin bulunduğu ve fibronektin ekspresyonunun yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Jiang ve arkadaşları (endotel hücre öncülleri olduğu iddia edilen) iğsi hücrelerin sinir lifi tabakasına göçmelerinden önce de Astrositlerin bu bölgede var olduğunu ve fibronektin m-RNA düzeylerinin yüksek seyrettiğini göstermişlerdir (52). Yazar bu bulgulardan yola çıkarak vaskülogenezi migrasyon ve diferensiasyon fazlarına ayırmayı teklif etmiştir (51). Migrasyon fazında fibronektin salınımı astrosit ve endotel hücre prekürsörlerine bağlıdır. Diferensiasyon fazını ise Laminin belirler. Laminin salgısının nasıl ve kimin tarafından regüle edildiği ise şimdiye kadar gösterilememiştir. Ekstraselüler matriks proteinlerinden Tenascin-C ilk olarak nöral krista gelişimi sırasında orataya çıkar ve santral sinir sistemi gelişimi süresince yüksek düzeylerde kalır (12). Tenascin embiroda hücre çoğalması, göçü ve ekstraselüler matriksin yeniden şekillendirilmesinde rol alır (31). Erişkin sinir sisteminde ekspresyon yokken anjiyogenez, yara iyileşmesi gibi fizyolojik ya da tümöral damar gelişimi gibi patolojik olaylar sırasında tekrar eksprese olur (50).

Ekstraselüler matriks ile hücre etkileşimi *adezyon molekülleri* tarafından sağlanır. Anjiyogenez sırasında dört rol aldığı bilinen 4 adezyon molekülü ailesi İntegrinler, immün-globulin süper ailesi üyeleri, cadherin’ler ve selectin’lerdir (4, 7). İntegrinle ekstraselüler matriks reseptörleri olarak da tanımlanabilir ve ekstraselüler matriks ile hücre iskeletini oluşturan Aktin filamanları arasında (adaptör moleküller eşliğinde) bir köprü oluştururlar (7). Transmembran glikoprotein heterodimerlerinden oluşan İntegrinler 24 farklı Alfa ve 9 farklı Beta genine sahiptirler. İntegrinler bu genlerin “Alternate Splicing” ile işlenmesi sonucunda çok geniş bir ligand ailesine yanıt verebilir (7). Örnek olarak integrin α v- β 3, vitronektin, fibronektin, vonWillebrand faktörü, fibrinojen, PECAM, MMP-2 gibi birçok liganda bağlanır (7). Bu reseptörün hem

vaskülogenez hem de anjiyogenezde rol aldığı bilinir (7, 13, 14, 26). Hücre içi etkiler İntegrin reseptörünün enzimatik bölgesi çevresinde yoğunlaşan “focal adhesion kinase (FAK)” molekülleri ve bunların “src” ikincil mesajcı sistemi ile olan etkileşimi sonucunda gerçekleşir (7).

Anjiyogenezde rol alan faktörler bilinmekle birlikte integrinler haricindeki ailelerin anjiyogenez sırasında aldıkları roller konusundaki bilgi çok sınırlıdır.

3.2. Serebrovasküler gelişim

Vaskülogenez iki basamakta gerçekleşir: Mezodermal hücrelerden anjiyoblastların gelişimi ve anjiyoblastların primitif kan damarlarını oluşturmak üzere organize olması. Gastrulasyon evresinde mezodermal kök hücrelerden anjiyoblastların gelişimi FGF’lerin etkisi ile olur (4, 15, 43). Embriogenezin erken dönemlerinde anjiyoblastlar baş-boyun bölgesine göçerler (4, 43). Anjiyoblastların vasküler endotel hücrelerine dönüşmeleri VEGF ve flk-1 tarafından sağlanır (43). Embriyo beyinde vaskülogenez primitif meninksler seviyesinde lokalize ve fibronektinden yoğun bir matriksle karakterize “*Ekstraserebral Vasküler Pleksus*” oluşumu ile biter. Vaskülogenezin erişkinde de olduğu ve bu proseste kemik iliği kökenli vasküler kök hücrelerin rol aldığı gösterilmiştir (94).

Beyin gelişiminde anjiyogenez de önemli bir rol oynar (43). Gelişen nöro-ektodermin yarattığı metabolik gereksinim sonucunda salgılanan anjiyogenetik faktörler vasküler endotel hücrelerinin *Ekstraserebral Vasküler Pleksus*’tan *Periventriküler Matriks* bölgesine göçmelerini sağlar. Periventriküler matrikste VEGF mRNA’sı (11), ekstraserebral vasküler pleksustan göçen endotel hücrelerinde ise flk-1 reseptörleri (63) gösterilmiştir. Bu damar göçü aynı zamanda Ang-1 bağımlıdır (85).

Erişkinde ise anjiyogenez sıkı şekilde denetim altındadır (4, 43, 93). Robertson ve arkadaşları sıçan beyinde vasküler endotel hücrelerinin sadece %0,3’ünün ³H uptake gösterdiğini, yani DNA replikasyonu yaptığını göstermiştir (78). Bu kontrol iskemi, metabolik patolojik prosesler (örn: diabetes mellitus) ve neoplastik proseslerde ortadan kalkar (93).

3.3. Retinal gelişim ve damarlanma

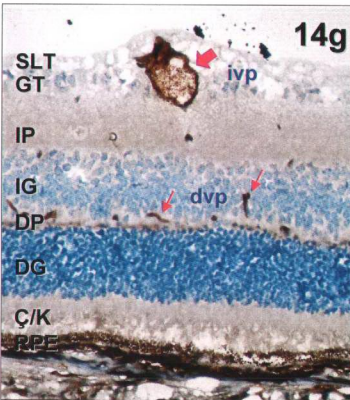
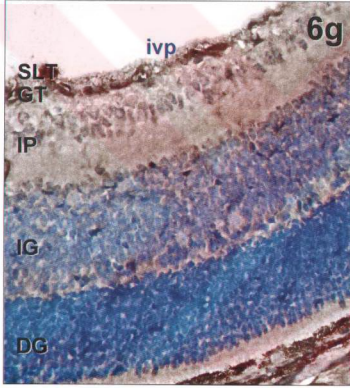
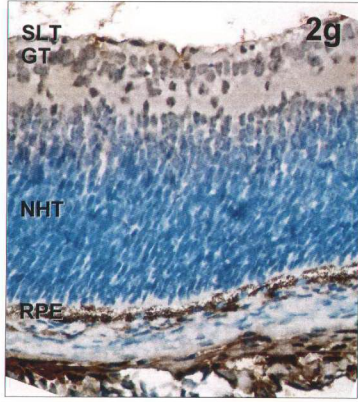
3.3.1. Histolojik değişiklikler

Retinal damar ağı ince kapillerlerle birbirine bağlanan iç ve dış olmak üzere iki pleksustan oluşur (47). Retinal vasküler gelişim birçok farklı türde incelenmiştir (17, 19, 21, 66, 91). Yenidoğan rodent retinası insandakinin aksine avaskülerdir (17, 19, 21, 48, 66, 91) C57b fare modeline yapılan bir çalışma retinal damar gelişiminde 3 faz saptamıştır (21). İlk fazda (0 ile 10. günler arası) avasküler retinada damarların sinir lifi tabakasının (retinanın merkeze en yakın tabakası) içinde optik diskten Ora-serrataya doğru radyal yayılım gösterdikleri gözlenmiştir. Postnatal 4. günden itibaren başlayan fazda daha derin retinal katmanlarda damarlanma başlar. Üçüncü faz ise ve postnatal 7. günden itibaren başlar ve derin tabakalarda damarlanma ile karakterizedir. Bu faz 20. güne kadar sürer. Gelişen damarların bir kısmı selektif olarak regresyon göstermekte ve sonuçta yerini olgun vasküler ağa bırakmaktadır (21). Retinada bu regresyonun apoptotik mekanizma ile olduğu ortaya konmuştur (15). Murata ve arkadaşları neonatal sıçanda çini mürekkebi perfüzyonu ve immunohistokimya teknikleri ile neonatal vasküler gelişimi 3, 7, 14 ve 30. günlerde incelemiş ve damar gelişiminin aşamalarını detaylı şekilde tanımlamıştır (66). Genel görüntü ele alındığında 3 günlük retinal damarlar geniştirler ve büklüntülü seyir gösterirler. Optik sinir çevresindeki bölgede kapillerlere rastlanır. 10 günlük retinada arter seyirleri düzleşir (66). Ondördüncü günde tüm damarlar ora serrataya kadar ulaşır (66). 30 günlük retina ise tamamen matür görünümündedir (66).

Damar gelişiminin sinir lifi tabakası ve iç nükleer (=iç granüler) tabakanın dış pleksiform tabaka ile birleşiminde gerçekleştiğini bu çalışma ile tekrar doğrulanmıştır. (66). Retinal gelişim sırasında damarlanma ilk olarak (Vitreusa en yakın tabaka olan) sinir lifi tabakasında başlar ve bu tabakadaki damar ağı *iç vasküler pleksus* olarak isimlendirilir (66)(resim1). Damar ağı optik diskten başlayarak konsantrik olarak yayılır. Yedinci günde damarların %83.3'ü ora serrataya kadar ulaşır (66). Daha sık aralıklarla inceleme yapan diğer araştırmacılar damarlanmanın ora serrataya 10. günde ulaştığını bildirilmişlerdir (21). Yedinci güne gelindiğinde nöroblastik tabaka iç ve dış granüler tabakalar olarak ikiye ayrılır ve iç granüler tabakanın dış kısmında yeni bir

vasküler ađ oluşumu başlar (**resim1**). Bu ikinci tabaka *dış vasküler pleksus* olarak isimlendirilir ve 20. gune kadar olgunlaşarak gelişmesini sordurur (**resim1**). İ vasküler pleksusta başlangıçta arter ve venlerin haricinde ince kapillerler de bulunur; dış vasküler pleksus ise sadece kapillerlerden oluşur. İ vasküler pleksustaki kapillerler gelişimin ileri safhalarında ortadan kalkar ve erişki retinasında i vasküler pleksusta arter ve venler, dış vasküler pleksusta ise kapillerler bulunur (66).





Resim-1

Retinal gelişimin farklı dönemlerinde, sırası ile 2, 6 ve 14 günlük neonatal C57B-fare retinalarında VEGF proteininin immühistokimyasal gösterilmesi.

2g: 2 günlük fare retinasında nöroblastik hücre tabakasının daha iç ve dış granüler tabakalara ayrılmış olduğu izlenmektedir. VEGF boyanması sadece sinir lifi tabakası ve retina pigment epitelinde mevcuttur. Derin tabakalarda damar yapısı yoktur. Retina pigment epitelindeki yoğun boyanmaya dikkat ediniz (40x).

6g: 6 günlük retinada nöroblastik hücre tabakasının iç ve dış granüler tabakalara ayrıldığı gözlenmektedir. VEGF immünoaktivitesi sinir lifi tabakasında yoğunlaşmaktadır. İç granüler tabakada damar yapıları daha gözlenmemektedir (40x).

14g: 14 günlük retina daha matür görünümündedir. VEGF boyanması iç vasküler pleksustaki damarlar (büyük ok) ve dış vasküler pleksustaki kapillerlerde (küçük oklar) izlenmektedir (40x).

Formaldehid fikasyonu sonrası parafine gömülmüş dokulardan alınan 10µm'lik kesitler monoklonal anti-fare VEGF antikoru (Oncogene Science, Cambridge, England) ile immunohistokimya teknikleri kullanılarak boyanmıştır.

Kisaltmalar:

SLT sinir lifi tabakası,
GT ganglion tabakası,
NHT nöroblastik hücre tabakası,
RPE retina pigment epiteli,
IP iç pleksiform tabaka,
IG iç granüler(nükleer) tabaka,
DP dış pleksiform tabaka,
DG dış granüler tabaka,
Ç/K çomaklar ve koniler,
IVP iç vasküler pleksus,
DVP dış vasküler pleksus

3.3.2. Gelişim teorileri

Retinal vasküler gelişim için iki teori vardır. Bunlardan ilki vasküler ağın temellerinin göçebe mezenkimal hücreler tarafından vaskülogenezle atıldığını ve ikincil ağın (bundan tomurcuklanarak) anjiyogenezle oluştuğunu kabul eder. İkinci bir teori ise tüm retinal ağın anjiyogenezle var olan damarlardan geliştiğini iddia eder. Memelilerin birçok türünde retinal vasküler gelişimin ilk safhalarında bir işsi hücre ağının retinal damarlanmaya öncülük ettiği ve iç damar ağının önünde hareket ettiği gösterilmiştir (19, 35, 48). Bu ağ aynen retinal damarlar gibi optik sinirden kaynaklanmakta ve radyal olarak ora serrataya doğru büyümektedir. İşsi hücrelerin kaynağı tartışmalıdır. Kedi ve insan fetal retinalarında bu hücreler ortaya konmuş bir süre sonra yerlerini vasküler ağlara bıraktıkları için vaskülogenezden sorumlu mezenkimal kaynaklı hücreler oldukları düşünülmüştür (19,48). Dolayısı ile farede **primitif** retinal damarlanmanın 0 ile 7. günler arasında **vaskülogenezle** olduğu ortaya atılmıştır (28, 44, 67). Anatomik olarak bundan daha farklı olan ikinci bir vasküler ağ daha derin retinal tabakalarda postnatal 4 ile 21. günler arasında (ilk vasküler ağdan tomurcuklanarak) **anjiyogenezle** oluşur.

İşsi hücrelerin kökeni

Jiang ve arkadaşları (51, 66) endotel hücre öncüleri olduğu iddia edilen işsi hücrelerin sinir lifi tabakasına göçmelerinden önce de bu bölgede astrositlerin var olduğunu ve damar gelişimini haber veren ekstraselüler matriks yapıtışı Fibronektin m-RNA düzeylerinin yüksek bulunduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu retinanın primitif damarlanmasının bilinen vaskülogenez sürecinde olduğu gibi mezenkimal kökenli anjiyoblastlarca değil de glial hücreler tarafından regüle edildiğini düşündürmektedir. Daha önceki çalışmalarda VEGF salgısının sinir lifi tabakasında GFAP ile boyanan astrositler ve iç granüler tabakada ise vimentin ile boyanan Müler hücreleri tarafından olduğu gösterilmiştir (76). Buna ek olarak Fruttiger farede immuno-histokimyasal yöntemlerle mezenkimal kökenli olduğu iddia edilen işsi hücrelerin postnatal 0. günden itibaren PDGF- alfa ile ve postnatal 5. günden itibaren bir astrosit markeri olan GFAP

ile boyandıklarını göstermiştir (35). Bu ekspresyon özellikleri astrositlerle uyumludur ve daha önceki çalışmalarda iddia edildiğinin aksine selektif olarak Flk-1(VEGFR-2) eksprese eden ve gelişmekte olan damar ağının önünden giden (mezenkimal) hücrelere rastlanmamıştır. Flk-1(VEGFR-2) eksprese eden hücrelerde aynı zamanda flt-1(VEGFR1), CD34 ve kollajen-IV ekspresyonları da ko-lokalize olur. Anjiyoblastlar Flt-1(VEGFR1) eksprese etmez, dolayısı ile bu bulgu vaskülojenezi gerçekleştirecek olan anjiyoblastların yokluğu olarak yorumlanmış, retinal vasküler gelişimin **sadece anjiyogenezele** olduğu iddia edilmiştir (35). Bunu destekleyecek şekilde homozigot VEGF-“knock out” hayvanlarda (otokrin ya da parakrin VEGF salgısı yoktur) damar gelişimi yine de olur fakat oluşan damarlar ileri derecede anormaldir (16). Heterozigot VEGF “knock out” hayvanlarında (azalmış VEGF ekspresyonu) beyin (forebrain) mezenkiminde damar gelişimi gözlenmesine rağmen nöroepitelde vasküler gelişim yoktur (32). Beyin (forebrain) mezenkiminde damar gelişiminin vaskülojenezele buna karşılık nöroepitelde ise anjiyogenezele olduğu akıldaki bulundurulursa retinada sadece anjiyogenezin etkili olduğu düşünülebilir (28, 44, 67).

Retinanın diğer katmanları

Retinanın diğer katmanları olan pigment epiteli ve koroidde ise VEGF ekspresyonu hipoksi bağımlı değildir. Retinal gelişim süresince ve erişkinde bu ekspresyon belli bir düzeyde devam eder. Erişkinde VEGF aktivitesi bu katmanda vardır ve koroidin fenestre yapıda olan bu kapillerlerinin özelliklerini korumaları için gerekli olduğu düşünülmektedir. Retinitis pigmentosa hastalığında migratuar retina pigment epitel hücreleri tarafından çevrelenen retinal kapillerlerin fenestre morfoloji kazandıkları izlenmiştir. Ayrıca erişkinde fenestre yapıda olması gereken akciğer kapillerlerinin de devamlı VEGF ekspresyonu yaptıkları bilinmektedir. Erişkinde koroid pleksusta da devamlı VEGF ekspresyonu vardır (43). Devamlı ve yoğun ekspresyon gösteren koroid ve ekstraoküler kasların izolasyon sırasında elimine edilmesi ulaştığımız bilginin retina hakkında daha net olmasını sağlar. Unutulmaması gereken bir nokta da anjiyogeneze sırasında etki gösteren faktörlerin posttranskripsiyonel regülasyonlarının da olduğudur. RNA stabilizasyonu ya da proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları gibi olaylar salt RNA'ya hassas olan array sistemi tarafından saptanamaz.

3.4. Serebrovasküler gelişim modeli olarak retina

Retina embriyolojik gelişim sırasında diensefalonun bir uzantısı olarak gelişir. Nöronlar ve glial hücrelerin bulunduğu ve kan-beyin bariyeri benzeri bir kan-retina bariyeri oluşturan bu doku gelişimi açısından serebral doku ile yakın benzerlik gösterir.

Serebral doku ile benzerliği haricinde retinayı serebrovasküler gelişimin incelenmesi için ideal bir deney modeli haline getiren başka özellikler de vardır: Retina serebral doku ile karşılaştırıldığında daha az kompleks bir mimariye sahiptir. Retina kolay ulaşılır bir dokudur ve canlı organizmada in vivo incelenmesi mümkündür. Kalınlığının az olması nedeniyle tüm dokunun in-situ preparasyonları yapılabilir. Bütün yayma (whole-mount) preparasyonlarla retinanın alansal olarak da incelenmesi mümkün olur.

3.5. Model hayvanı olarak C57b faresi

Rodent retinasını deney modeli olarak çekici kılan bu türlerde retinal damarlanmanın tamamen doğum sonrası gelişmesidir. Avasküler bir retina ile doğan hayvanlarda vaskülojen ve anjiyogenezin farklı zaman aralıklarında oluşması incelemeyi kolaylaştırır. Birçok çalışmada C57b fare türünün kullanılmış olması bu türdeki vasküler gelişmeyi incelemek konusunda homojen bir bilgi birikimi sağlar.

3.6. Hipotez

Retinal vaskülojen ve anjiyogenez aynı büyüme faktörlerinin zamansal salınımlarındaki değişimlerle kontrol edilir.

3.7. Proje dizaynı

Deney deskriptif bir çalışma olarak planlanmıştır. Amaç retinal vasküler gelişim sırasındaki basamakların tanımlanması ve bunlar sırasında eksprese olan büyüme faktörlerinin zamansal değişiminin ortaya konmasıdır. Böylelikle neonatal retinanın serebrovasküler gelişim modeli olarak kullanılması için referans değerler ortaya konmuştur.

Anjiyogenezde birçok büyüme faktörü rol alır. Bunların her birinin yalnız başına incelenmesi anjiyogenez hakkında yeterli bir genel fikir vermemekte, tüm faktörlerin sistematik incelemesi ise çok zaman ve emek gerektirmektedir. 1990'larda geliştirilmeye başlanan ve günümüzde rutin kullanıma girmiş olan "microarray" teknolojisi bu amaç için ideal yöntem olarak önümüze çıkmaktadır. Günümüzde anjiyogenez ile ilgili olduğu düşünülen büyüme faktörlerinin aynı anda ve aralarındaki etkileşimleri de gösterecek şekilde incelenmesi bu yöntemle mümkündür. Bu çalışmada "pathway specific array" sistemi kullanılarak anjiyogenez ile ilişkili 96 gen incelenmiştir.

1.1.1. Mikroarray sistemleri

Mikroarray sistemleri kullanılan cam ya da membran yüzey üzerine yerleştirilen DNA oligonükleotid problemlarına bağlanan örnek DNA'sının işaretlenerek gösterilmesine dayanır. Bunun için hücreden izole edilen RNA polimeraz zincir reaksiyonu ile cDNA'ya dönüştürülür. DNA Kullanılan oligonükleotid problemlarının yerleştiği yatak büyüklüklerine göre "Microarray" (200 mikrondan küçük) ya da "Macroarray" (300 mikrondan büyük) olarak isimlendirilir (80).

Günümüz "microarray" sistemleri aynı anda onbinden fazla genin ekspresyon durumunu gösterebilmekte ve kabaca tüm genomu "whole-genome microarray" olarak isimlendirilmektedir. Fakat bu geniş ekspresyon görüntülerinin yorumlanması bir sorun yaratmakta ve böylesine geniş bir gen yelpazesini taramak deney maliyetini çok artırmaktadır. Bu gereksinimden "focussed microarray" sistemleri doğmuştur. Bu sistemler daha önceden ilişkileri bilinen ya da tahmin edilen bir grup geni hedef alır ve array üzerinde yer alacak olan genler otomatik şekilde üretilir. Bu yöntemin ticari hale gelişi ile birlikte üretim maliyetini çok düşüren "knowledge based array" kavramı

doğmuştur. Bu sistemler ilişkisi daha önce bilimsel olarak gösterilmiş bir grup geni hedef alır (örn: anjiyogenez, ekstraselüler matriks elemanları, hücre içi sinyal iletimi).

Hücreden RNA izolasyonu, bundan cDNA sentezi ve bunun array üzerinde gösterilmesi günümüzde rutin olarak kullanılan moleküler biyoloji yöntemlerine dayanır (80). Bu reaksiyonlarda mutlak optimizasyon sağlanmış değildir (80). Her ne kadar bu yöntem güvenilir şekilde klinik tanıda dahi kullanılsa bile her basamak sırasında daha önceden öngörülemeyecek ve sağlaması yapılamayacak bilgi kayıpları ya da hatalar da oluşmaktadır. Dolayısı ile "microarray" sistemlerinden elde edilen bilgi mutlak değerleri yansıtmaz fakat semi-kantitatifdir (37).

3.8. Deneyin geliştirilme potansiyeli ve kullanım alanları

Tanımlanan deney modeli serebral damar gelişimi hakkında sınırlı olan bilgimizi artırabilmek son derece pratik bir çözüm sunmaktadır.

Anjiyogenez normal doku onarımından, serebral vasküler malformasyonlara ve tümör gelişimine kadar birçok patolojik ve doğal proseste aktif rol oynar. Aynı model kullanılarak vaskülogenez ve anjiyogenezde rol alan sinyal yolları selektif olarak manipüle edilebilir ve bunun hem sonuçta oluşacak fenotip ve diğer büyüme faktörlerinin salınımındaki değişiklikler incelenebilir. Model aynı zamanda günümüzde serebral vasküler malformasyonların (ve potansiyel olarak neoplastik patolojilerin) tedavisinde kullanılan drog ve tekniklerin denenmesi için de uygundur.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Denek hayvanları

Bu projede C57b fare cinsi kullanılmış, fareler TÜBİTAK-Marmara Araştırma merkezi laboratuvarlarından sağlanmıştır. Deneklere *ad-libidum* su ve yiyecek

sağlanmış ve deney sırasında damızlık olarak kullanılan hayvanlardan sağlanan dölütlerin tek bir jenerasyonu deneye kabul edilmiştir.

Bu deney Marmara Üniversitesi Hayvan Etik Kurul komitesi tarafından (29.09.2004) tarih ve (54. 2004. mar) sayı ile onaylanmıştır.

4.2. Retina izolasyonu

Doğum sonrası 0. günden başlayarak 20. güne kadar gün aşırı iki denek (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ve 20. günlerde) ve 6 haftalık iki denek letal dozda sodyum pentobarbital ile sakrifiye edilmiştir. Retinalar çift taraflı olarak RNAazsız PBS (Phosphate Buffered Saline) içinde diseksi edilmiştir. Örneklere retina pigment epiteli ya da ekstraoküler kas tabakasının karışmadığı pilot çalışmada hematoksilin-eozin ile boyanan piyeslerde histolojik olarak doğrulanmıştır (**Resim-2**).

4.3. Retinadan RNA izolasyonu

İzolasyon sırasında -20°C 'lik soğutma kalıbı üzerinde tutulan taze retina dokusu bekletilmeden homojenize edilerek intraselüler RNA serbestleştirilmiş ve ticari kit (Rneasy kit, Quiagen Inc., CA, USA) ile izole edilmiştir. Bu 200 nükleotidden küçük RNA'yı izole etmemekte ve selektif olarak mRNA oranının artmasını sağlamaktadır. İzolasyon işlemi sonucunda elde edilen RNA -20°C 'de saklanmıştır.

4.4. RNA saflık kontrolü

RNA örneği miktar, saflık ve örnek kalitesi açısından test edilmiştir.

Miktar değerlendirmesi için 1:500 oranında (dietyl pirokarbolat ile muamele edilerek RNAaz enzimi inaktive edilmiş) suda dereceli olarak seyreltilen RNA'nın 260nm dalga boyunda absorbanası spektrofotometrik (Shimadzu Inc. Japonya) olarak ölçülmüş ve her örnek için RNA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Saflık açısından spektrofotometrik olarak TRIS tamponunda seyreltilen edilen RNA'nın 260nm ve 280nm dalga boyundaki absorbanası spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve oranlanarak protein ya da DNA kontaminasyonu ekarte edilmiştir. İzole edilen RNA'nın

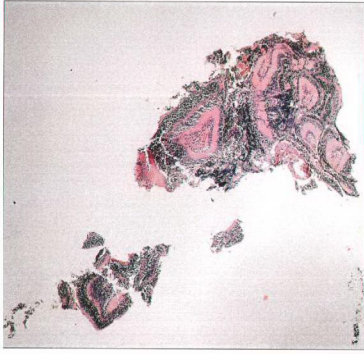
kullanılabilir olduğunu belirlemek için formaldehit jel elektroforezinde RNA'nın (degrade olmadığını belirleyen) 18s ve 28s bantları gösterilmiştir (**Resim-3**).

4.5. Array sistemi

Denyde "Superarray-GE array, Q series Mouse Angiogenesis Kit" (Superarray Bioscience Corporation, MD, USA) sistemi kullanılmıştır. Bu sistemde daha önce izole edilmiş olan örnek RNA'sı revers transkriptaz PCR tekniği ile Biotin-16-dUTP ile işaretli c-DNA formuna dönüştürülmekte ve bu 3.8 x 4.8 cm boyutlarındaki naylon array membranlarına hibridize edilmektedir. Örnek içinde var olan genlerin c-DNA'sı membran üzerindeki 96 gene ait problarla karşılaşmakta ve komplementer olanlar kutucuklara bağlanmaktadır. Bağlanmayan örneklerin uzaklaştırılması sonrası işaretli cDNA'yı bağlamış olan kutucuklar alkali fosfataz- streptavidin ve CDP-star ile boyanmaktadır. Elde edilen kemilüminesans kontak baskı ile "Kodak Scientific Film'e" kaydedilmiştir (**Resim 4**).

4.6. Görüntülerin ve bulguların işlenmesi

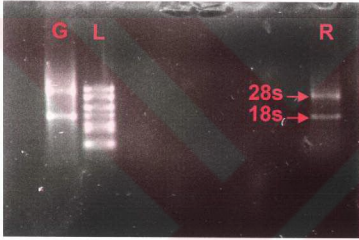
Film banyosu sonrası görüntüler bir "flat-bed scanner" ile bilgisayar ortamına aktarılmış, Scan-alyze 2.50 (Frank Eisen, Stanford University, USA) programı ile array kutucuklarındaki görüntü sayısal bir değere çevrilmiştir. Her deneyden elde edilen data Gearrayanalyzer 1.3 (SuperArray Inc. USA) programı ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sırasında 0 değeri olarak membranda okunan en düşük değer kabul edilmiş, normalizasyon içinse beta aktin geni kullanılmıştır. Elde edilen data tablosundan Excel 2002 (Microsoft, USA) programında grafikler hazırlanmıştır.



Resim-2

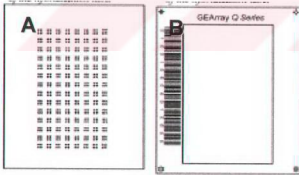
Örnek retinaları mikrodiseksiyon sonrası saflık açısından değerlendirilmiştir. Örneğin nöral retina dokusundan oluştuğuna ve retina pigment epiteli ya da ekstraoküler kas dokularının olmadığına dikkat ediniz.

100x büyütme, Parafine gömülmüş doku, Hematoksilen-Eozin



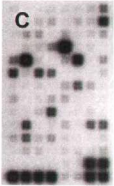
Resim-3

İzolasyon sonrası formaldehid jel elektroforezinde 28s ve 18s bantları gösterilerek mRNA'nın intact olduğunu verifiye etmiştir. İlk kolon degrade (sürüntü şeklindeki görüntü) ve intact mRNA'nın birlikte bulunduğu glioblastom dokusu, ikinci kolonda standart uzunluktaki RNA'lardan oluşan karışım, en sağ kolonda ise retinal RNA örneği görülmektedir.



Resim-4

Array membranının ön(A) ve arka(B) yüzleri. Kemilüminesan array membranlarının fotoğraf filmi üzerinde kaydedilmiş görüntüsü(C).



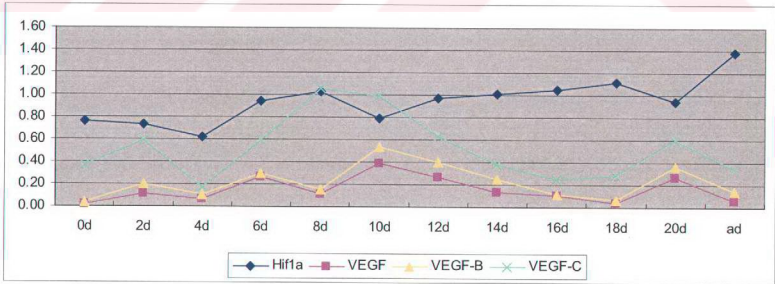
5. BULGULAR

Elde edilen tüm sonuçlar **tablo 2'**de sunulmuştur. Deney bulgularının büyüklüğü nedeniyle direk olarak inceleme pratik olarak mümkün değildir. Bundan dolayı bulguların incelenmesi sırasında birbiri ile alakalı gen grupları karşılaştırılmalı olarak ele alınmıştır. Oluşturulan gruplar **tablo 3, 4, 5 ve 6'**da gösterilmiştir. Önemli olduğu düşünülen gruplarda elde edilen bulgular sırası ile ele alınacaktır.

5.1. VEGF ailesi

VEGF ailesinden VEGF-A, -B ve -C ligandları kabaca benzer bir profil sergilerler. Her üç faktör de iki küçük ve bir büyük bir zirve yapar fakat VEGF'in her zirve sırasında diğer faktörlerden daha yüksek oranlara çıktığı gözlenir. Sıfırıncı gün değerleri ele alındığında her üç faktörün de erişkindeki düzeylerden daha düşük oldukları görülür. Bunun ardından her üç faktör de 2. günde zirve çizer. Altıncı günde başlayan ikinci bir zirveyi 10. günde bir diğeri takip eder. 10 günden sonra VEGF mRNA düzeyleri 18. günde en düşük değerlere inmek üzere düşüşe geçer. Her üç faktörün de 20. günde tekrar bir zirve yaptıkları görülür.

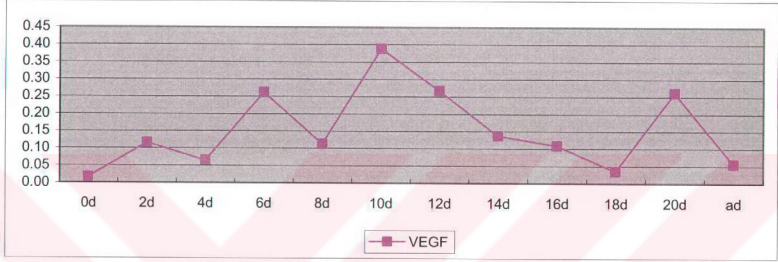
Şekil 1



Bu dört zirveden 10. günde başlayan en yüksek değerlere çıkar. VEGF'in bu noktada için erişkin değerinin 7 katına ulaştığı izlenir. Hipoksiye bağımlı VEGF salınımını sağlayan HIF-1A sadece 6. günde başlayan zirveye eşlik eder ve diğer 3 VEGF ligandı

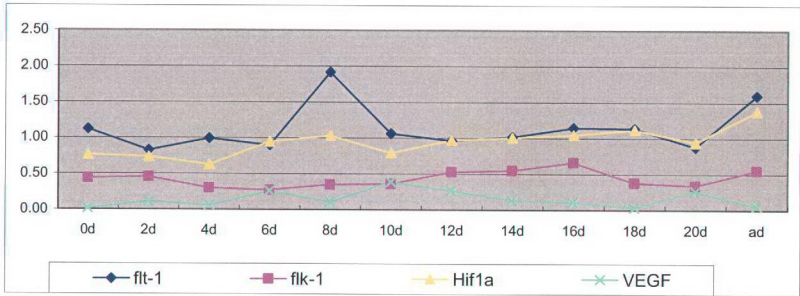
gibi 18. güne kadar azalmakla birlikte bu düşüşü 18. günde küçük bir zirve yaparak bitirir. Gözönünde bulundurulması gereken bir nokta HIF-1A'nın yaptığı hiçbir iniş çıkışın VEGF ligandlarındaki kadar belirgin olmadığıdır. Büyük zirvenin tepe noktasında (10. günde) HIF-1A, erişkin değerinin ancak 0.75 katına, ikinci zirve olan 18. günde ise erişkin değerinin ancak 0.8 katına ulaşır.

Şekil 2



Flt (VEGFR-1) reseptörü 0. günde erişkin değerinin 0.7 katında başlar ve yapacağı tek küçük zirvede 8. günde erişkin değerinin 1.2 katına ulaşır. Flk(VEGF-2/KDR) reseptörü ise 0. günde erişkin değerinin 0.8 katı ile başlar, diğer tüm aile elemanlarında farklı bir şekilde 8. günde tırmanmaya başlayarak 16. günde erişkin değerinin 1.katına ulaşacağı tepe değerini çizerek 20. güne kadar progresif düşer.

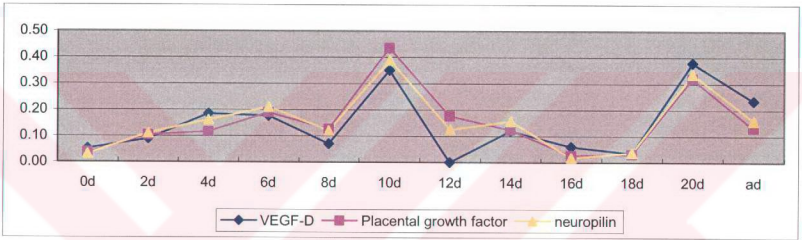
Şekil 3



Aileye ait diğer iki ligand olan VEGF-D (FIGF: Fos Inducible Growth Factor) ve PGF(Placental Growth Factor) kendilerine ait bir profil sergilerler. İkinci günde

başlayan büyük zirveyi 20. günde ikinci ve küçük bir zirve izler. Her iki ligand da 0. günde erişkin değerinden küçüktürler. Her iki faktör de 2. günde başlayan, 10. günde tepe noktasına ulaşan ve 16. günde sönen bir zirve yapar. Tepe noktasında VEGF-D erişkindeki 1.5 katı, PGF ise erişkindeki 3.3 katına ulaşır. Bir VEGF ko-reseptörü olan neuropilin benzer bir profile sahiptir. İkinci günde başlayan ve erişkin değerinin 2.5 katına ulaştığı 10. günde tepe noktaya gelen profil 16.güne kadar azalarak düşer. 20. günde de tüm ligandlarda izlenene benzer bir şekilde maksimum 2,12 kata ulaşan ikinci bir zirve gözlenir.

Şekil 4

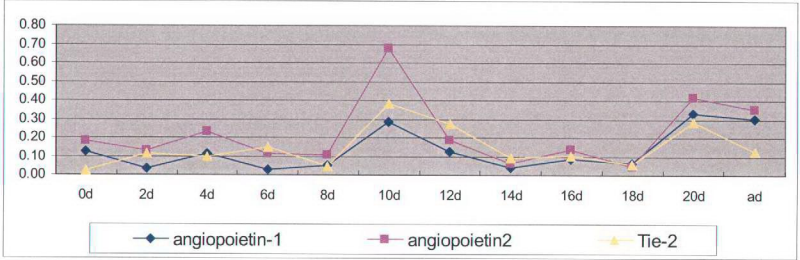


5.2. Angiopoietinler

İki angiopoietin ligandı çok benzer profiller çizerler. Ligandlar 10. ve 20. günlerde olmak üzere iki büyük zirve çizer ve erişkin hayvanda yüksek düzeylerde kalırlar. Büyük zirveler sırasında ligandlar erişkin düzeylerine ulaşırlar. Bunun istisnası 10. günde zirve sırasında angiopoietin-2'nin erişkin (ve o günde ki angiopoietin-1) değerinin iki katına ulaşmasıdır.

Tie-2 reseptör geni ise çok benzer şekilde 2, 6 ve 16. günlerde küçük, 10 ve 20. günlerde ise büyük zirveler çizer. 10. günde büyük zirve sırasında erişkin düzeyinin 3.1 katına, son olarak 20. günde zirve sırasında ise 2,3 katına ulaşır.

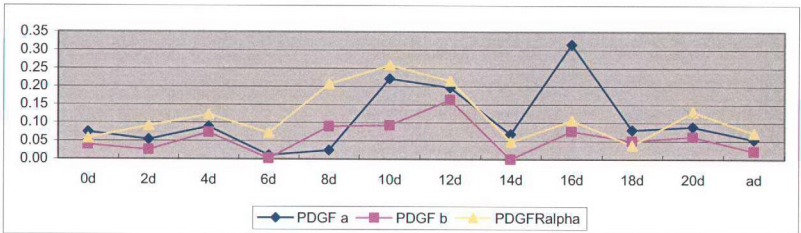
Şekil 5



5.3. PDGF ailesi

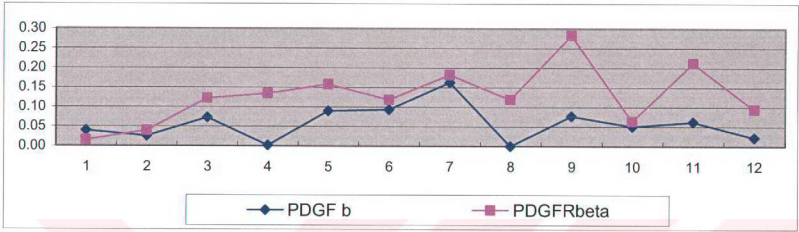
PDGF-A ligandı 4., 10 ve 16. günlerde toplam üç zirve çizer. Onuncu günde başlayan zirve iki gün sürer ve tepe değeri erişkin düzeyinin 4,15 katına ulaşır. 16. günde olan zirvede ise erişkin düzeyinin 5,85 katına çıkar. Erişkin düzeyleri yenidoğanla karşılaştırılabilecek düzeylerde dir. PDGF-B ligandı da buna benzer bir profil çizer. Dördüncü günde olan zirve büyük benzerlik göstermesine rağmen ikinci zirve 10. yerine 8. günde başlar, 12. günde ikinci kez yükselir ve erişkin değerinin 1,93 katına ulaşır. Ondördüncü günde bu zirve sonlanır. 16. günde olan zirve PDGF-A ligandındaki kadar belirgin değildir. PDGF-alfa reseptörü 4, 8, 16 ve 20. günlerde dört adet zirve çizer. Sekizinci günde başlayan büyük zirve dört gün sürer ve tepe noktasında erişkin değerinin 3,60 katına ulaşır. PDGF- α reseptörü erişkinde 0. günde kinin 1,3 katı düzeyinde bulunur.

Şekil 6



PDGF- β reseptörü sekizinci güne kadar progresif yükselir, 12. ,16. ve 20. günlerde üçüncü kez daha zirve yapar. Onaltıncı gündeki en yüksek zirve sırasında erişkin değerinin 2,99 katına ulaşır. Erişkin değeri ile 0. gün değerleri arasında belirgin bir fark yoktur.

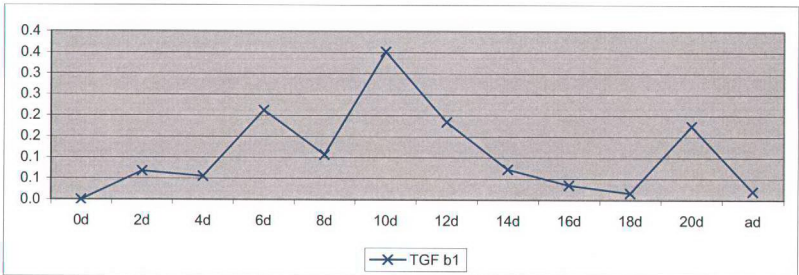
Şekil 7



5.4. TGF-beta ailesi

TGF- β 1 2. günde küçük, 6. ve 20. günlerde orta ve 10. günde daha belirgin olmak üzere toplam dört zirve çizer. TGF- β 1 ikinci gündeki ilk zirvede erişkin değerinin 3.5 katına 6. gündeki ikinci zirvede erişkin değerinin 10,5 katına, 16. gündeki üçüncü zirvede erişkin değerinin 17,4 katına, 20. gündeki zirvede ise erişkin değerinin 8,3 katına ulaşır.

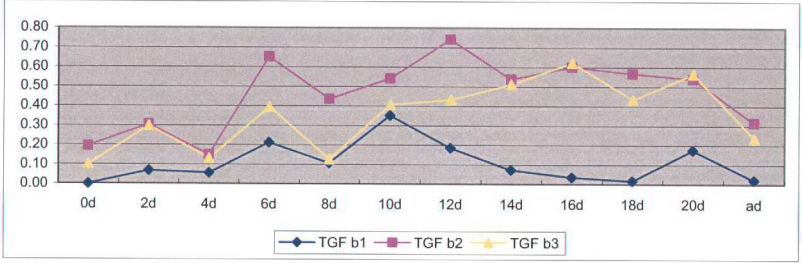
Şekil 8



TGF- β 2 ve TGF- β 3 2 ve 6. günlerde iki adet zirve çizdikten sonra 10. günden itibaren bir plato çizer. Bu plato sırasında TGF- β 2 12. günde, TGF- β 3 ise 16. ve 20. günlerde

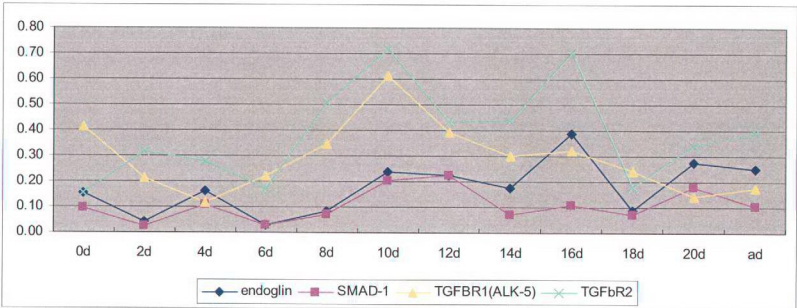
zirveler çizer. Her iki ligand da erişkinde bu plato değerinin altına düşse de TGF- β 2 yenidoğandakinin 1,6 katı, TGF- β 3 ise yenidoğandaki değerinin 2,3 katında kalır.

Şekil 9



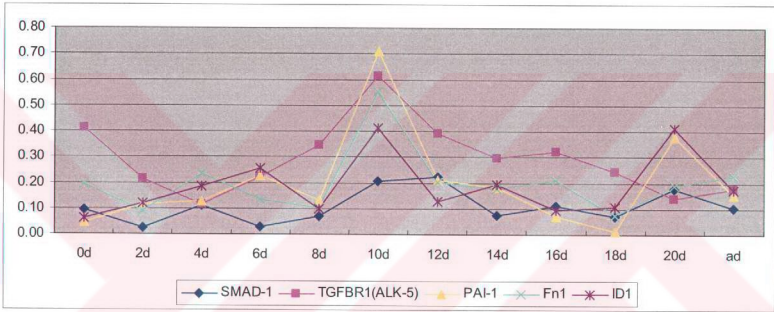
TGFBR-2 iki, 10,16 ve 20. günlerde zirveye ulaşır ve sırası ile erişkin değerinin 0,84 , 1,84, 1,80 ve 0,87 katı olarak ölçülür. TGFBR-1(ALK-5) ise 0. günde erişkin değerinin 2,32 katı ile başlayan bir profil sergiler ve yaptığı tek zirve sırasında erişkin düzeyinin 3,46 katına ulaşır. Endoglin 4, 10, 16 ve 20 günlerde zirve yapar. 10. gündeki zirve 2 gün sürer. TGF- β yolağı tarafından kullanılan ikincil habercilerden olan SMAD-1 endoglinde benzer bir profil çizer ve 4, 10, 16 ve 20. günlerde zirve yapar. Fakat 4 ve 16. gündeki zirveler küçük, 10 ve 20. günlerdeki büyük zirvelerdir. 10. gündeki zirve toplam 2 gün sürer.

Şekil 10



TGF- β yolağının hedef moleküllerinden fibronektin 4, 16 ve 20. günlerde üç küçük zirve, 10. günde ise büyük bir zirve yapar. Diğer bir hedef gen olan ID-1 (Inhibitor of DNA Binding) 0. günden 6. günde kadar artar ve 6. günde erişkin değerinin 1,49 katına ulaşır. On ve 20. günlerdeki zirveler sırasında ise erişkin değerinin sırası ile 2,40 ve 2,39 katına ulaşır. Üçüncü olarak ele alınacak olan hedef molekül plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) 6. günde küçük, bunun ardından 10 ve 20. günlerde iki büyük zirve yapar. Büyük zirveler sırasında 10. günde erişkin değerinin 4,64, 20. günde ise erişkin değerinin 2,47 katına ulaşır.

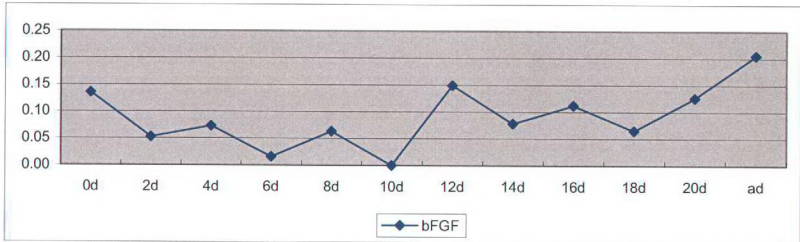
Şekil 11



5.5. FGF ailesi

Hem vaskülogenez hem de anjiyogenezde önemli rol oynadığı düşünülen bazik fibroblast büyüme faktörü (FGF2) 0'dan 10. güne kadar azalır. Onikinci günde tekrar zirve yapan ligand erişkinde en yüksek düzeyine erişmek üzere yükselir.

Şekil 12

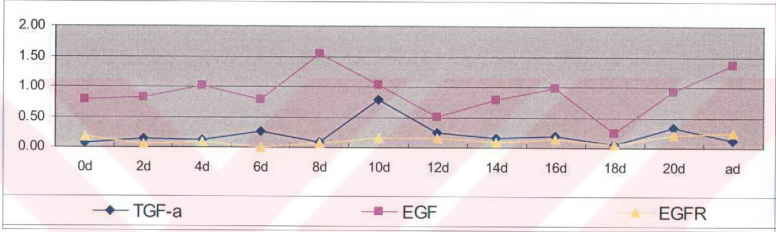


5.6. EGF/TGF- α ailesi

TGF- α altı, 16 ve 20. günlerde küçük, 10. günde ise daha belirgin olmak üzere dört kez zirve yapar.

EGF ligandı 4, 8, 16 ve 20. günlerde zirve değerlerine ulaşır, 20 günde ulaşılan zirve değerini erişkin hayvanda da korur. EGFR reseptöründe ise 20 günlük süre boyunca pek belirgin bir dalgalanmaya rastlanmaz.

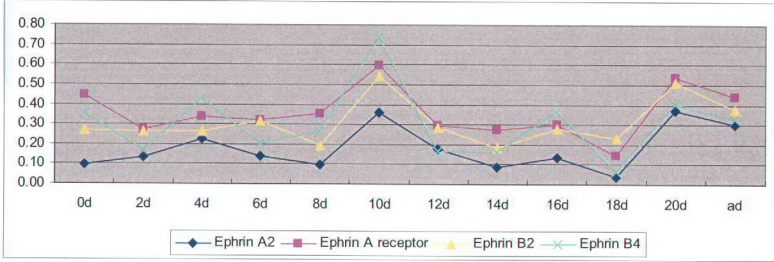
Şekil 13



5.7. Ephrin ailesi

Ephrin-A2 4., 10, 16 ve 20. günlerde zirveler çizer ve erişkinde 0. gündeki değerinin 3 katına ulaşır. Ephrin A reseptörü olarak da bilinen Ephrin-A5 0. günde yüksek bir değerle başlayan, 10. ve 20. günlerde iki zirve çizdikten sonra erişkinde tekrar 0. gündekine yakın yüksek bir değerle biten bir profil çizer. Ephrin-B2 2, 10, 20. günlerde 3 adet zirve çizer. Ephrin-B4 ise ephrin-A2'ye benzer bir şekilde 4, 10, 16 ve 20. günlerde olmak üzere dört zirve çizer. Sıfırıncı günde ve erişkinde yüksek değerlerdedir.

Şekil 14



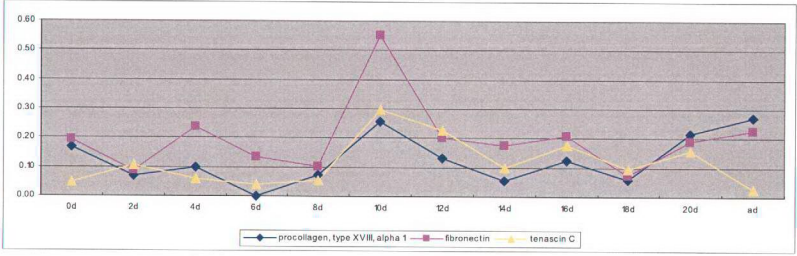
5.8. Ekstraselüler matriks

Olgun vasküler bazal laminaya spesifik olan kollajen[α 1(XVIII)]₃ geni 4 ve 16. günlerde iki küçük zirve çizer. Bunlardan daha belirgin olmak üzere 10. günde ve erişkinde zirveler izlenir. Onuncu günde sinir lifi tabakasının ve 20. günde tüm retinal damarların olgun hale geldikleri düşünülürse bu iki noktada vasküler bazal laminanın ana yapı taşı olan kollajenin artması beklenen bir bulgudur (21).

Fibronektin 4, 10 ve 16. günlerde zirveler çizer fakat bunlardan sadece 10. günde olan kayda değerdir. Fibronektinin hücre yüzeyindeki reseptörü olan integrin-A5 (fibronectin receptor- α) 10. günde fibronektin ile birlikte yaptığı zirve haricinde 6. ve 20. günlerde fibronektin ile korele olmayan iki zirve daha yapar. İntegrin-a5'in çizdiği profil İntegrin-aV'in profili ile büyük benzerlik gösterir. İntegrin-aV farklı olarak 14. günde bir zirve daha çizer.

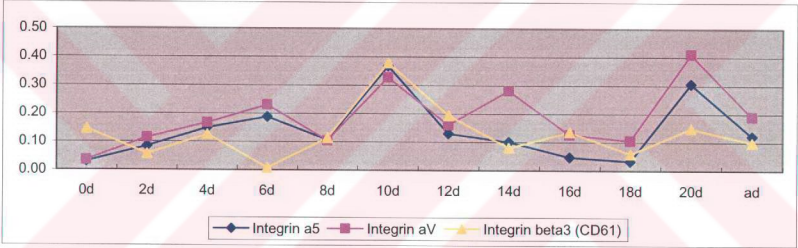
Primitif ekstraselüler matriksin önemli proteinlerinden tenascin-C'nin de 10, 16 ve 20. günlerde zirveler çizdiği izlenir.

Şekil 15



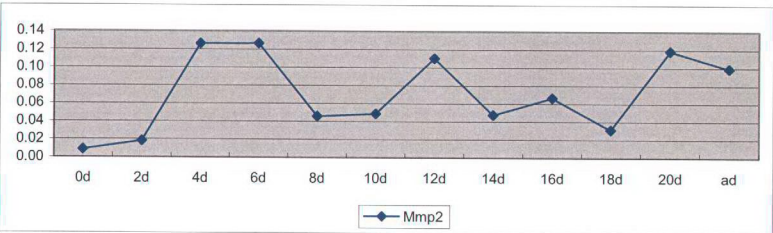
AlfaV- β 3 integrin anjiyogenezin devamı için mutlak gereklidir (30). İntegrin- β 3 mRNA düzeyleri tenascin'e çok benzer bir profil çizer ve 4, 10, 16 ve 20. günlerde yükselir. İntegrin α V'nin ekspresyonunun ise 6, 10, 16 ve 20. günlerde zirveler çizdiği izlenir.

Şekil 16



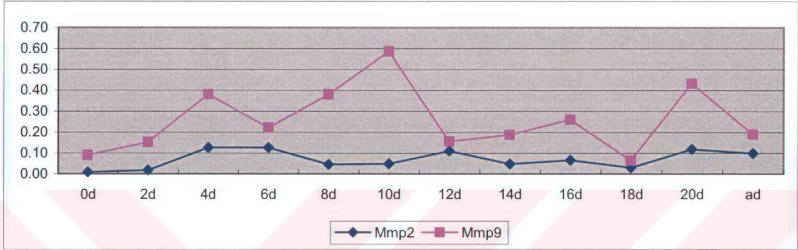
Ekstraselüler matriks yıkılımdan sorumlu olan MMP-2 ilki 4. günde sonrakiler 12 ve 20. günlerde olmak üzere toplam üç zirve yapar.

Şekil 17



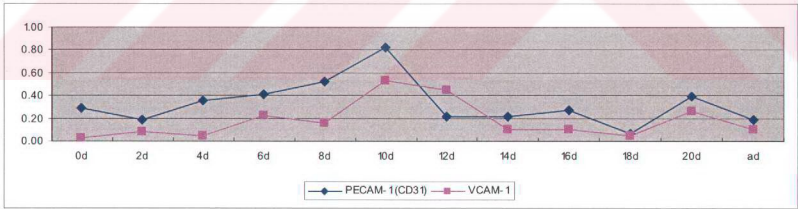
Bazal membranın yıkılmasından sorumlu olan MMP-9 ise 4, 10, ve 20 günlerde olmak üzere toplam üç zirve yapar. Bu zirverler sırasındaki yükselişleri MMP-2'ye göre daha belirgindir.

Şekil 18



Anjiyogenez sırasında immün hücrelerin bölgeye gelmeleri ve inflamasyonun başlamasında önemli rol oynayan hücre yüzey reseptörleri PECAM ve VCAM da ilki 10. günde ikincisi ise 20. günde olmak üzere iki adet zirve çizer.

Şekil 19



Deneyde elde edilen bulguları, anjiyogenetik gen ekspresyonlarında olan en belirgin değişimleri incelemek amaçlı olarak, +2 standart sapmalı bir sınır değeri ile filtrelediğimizde 41 adet genin en az bir ölçümde +2 standart sapmadan yüksek düzeylere çıktığı görülmüştür. Bulgular bu şekilde ele alındığında ortaya çıkan özellikler **tablo 7**'de gösterilmiştir.

6. TARTIŞMA

Yenidoğan farede retinal gen ekspresyonlarında gözlenen en belirgin zirveler ele alındığında bunların 8, 10, 12, 16 ve 20. günlerde yoğunlaştıkları izlenir.

Onuncu günde zirve yapan faktörlerin tümü pro-anjiyogenetik ve anjiyogenezin başlangıç aşamasında etkili olanlardır. Tüm bu faktörlerin 10. günde zirve yapmaları bu günde anjiyogenezin tetiklenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Neonatal retinal sinir lifi tabakasında, optik diskten başlamış olan damar gelişimi 10. günde ora serrataya kadar uzanır. Sinir lifi tabakasını takiben daha derin tabakalarda da damarlanma başlar (21). Literatür bilgisi *dış vasküler pleksustaki, kapillerlerin anjiyogenez ile oluştukları* yönündedir (35). Onuncu günde anjiyogenezin başlangıç basamağında görev alan faktörlerin eksprese olmaları bu bilgi ile uygunluk gösterir.

Fakat bulgulardan 10. güne kadar olan gelişimin hangi mekanizma ile gerçekleştiğine dair net bir sonuç çıkarmak mümkün değildir. Deney bulguları *iç vasküler pleksustaki damarlanmanın anjiyogenezle olmadığı* yönündedir. Çünkü anjiyogenezde rol aldığı bilinen faktörlerin gen ekspresyonlarında bu dönemde belirgin bir değişim izlenmemiştir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde insan fetal retinasında, vaskülogenezle oluştuğu bilinen, iç vasküler pleksusun gelişimi sırasında VEGF mRNA'sı gösterilememiştir (47). İnsanda iç pleksus (nöronal farklılaşmadan çok önce) 14. haftada gelişmeye başlar ve 18. haftada retina yüzeyinin %54'ünü kaplar, oysa VEGF RNA'sı ancak 20 haftada ortaya çıkar (47).

İlk 10 günde anjiyogenetik faktörlerde belirgin bir zirve izlenmemesi bu dönemdeki gen ekspresyonlarının "microarray" sistemi tarafından algılanmaması ya da bulguların anlamlılık sınırına ulaşamamasından kaynaklanabilir. Fakat optik sinirden ora serrataya kadar uzanan geniş bir alandaki damarlanmanın gen ekspresyonunda belirgin bir değişiklik olmadan gelişmesi olası görünmemektedir. Retinal damarlanmanın başta vaskülogenez ve ardından başlayan anjiyogenez ile gerçekleştiği hipotezi anjiyogenezle ilgili genlerdeki değişiklikleri açıklayabilse de ilk 10 günlük dönem içinde vaskülogenezde rol aldığımız bildiğimiz Flk-1, VEGF, FGF gibi genlerde selektif ve net artışlar izlenmemiştir. Vaskülogenez mezenkimal kökenli endotel öncü hücrelerinin damarlanmanın olacağı alana göçmesi ve tübüler yapılar oluşturması ile karakterizedir. Retinada damar ağının oluşumundan önce öncü olarak gösterilebilen iğsi hücrelere

rastlanmıştır. Birçok yazar farklı kriterler kullanarak retinal damarlanmanın önünde giden bu işi hücrelerin mezenkimal kökenli anjiyoblastlar olduklarını savunmakta ve ilk damarlanmayı vaskülogenez olarak kabul etmektedir (47, 51, 66). Fakat bu hipotezin güçsüzlüğü mezenkimal kökenli anjiyoblastların niye vasküler markerler yerine astrosit yüzey reseptörleri taşıdığını açıklayamamasıdır (35). Flk-1 gibi, anjiyoblast markeri olduğu genel kabul gören faktörler bu işi hücreler üzerinde gösterilememiştir. Bizim çalışmamızda da ilk damar ağının oluştuğu bu 10 günlük süre içinde bu faktörlerin ekspresyonlarında belirgin bir değişiklik olmaz. Fruttiger isimli araştırmacı fare retinal damarlanması sırasında bu işi hücrelerde flk-1 ekspresyonunu immunohistokimya ya da in-situ hibridizasyon teknikleri ile gösterememiştir (35). Sonuç olarak ilk vasküler ağın hangi mekanizma ile oluştuğu daha kanıtlanmamıştır. Kesin olan, ilk 10 gündeki damarlanmanın *metabolik gereksinim ve hipoksi ile tetiklenmiş VEGF ekspresyonundan bağımsız* olarak geliştiğidir (47). Bu sürecin detaylarını ortaya koyacak yeni çalışmalara gereksinim vardır.

Daha önce belirtildiği gibi onuncu günde anjiyogenezin başlangıç safhasında rol alan faktörlerde belirgin bir artış izlenir. Bu ani artış retinal gelişimde bu günler civarında önemli bir anjiyogenetik uyarana işaret eder. Dış retinal vasküler pleksusun oluşumundan sorumlu olan anjiyogenezin VEGF bağımlı olduğu ve anjiyogenezin de hipoksi ile indüklendiği bilinmektedir (47, 64, 77). Farklı yazarlar görmenin başlamasının anjiyogenezi indüklendiğini ortaya atmışlardır (47, 64, 77). Bu hipoteze göre görme olayının nöral aktiviteyi artırarak getirdiği metabolik yük ve oluşturduğu rölatif hipoksi sonucunda VEGF salgısı artar ve anjiyogenez başlar (17-20, 47). Zamanlama olarak bu deneyde gözlemlenen “pro-anjiyogenetik dalga” da neonatal farede göz açmanın başlaması ile örtüşmektedir. Benzer şekilde insanda iç vasküler pleksusun oluşumu göz açma ve ilk VEP (görsel uyarılmış potansiyeller) kayıtları ile çakıştığı gösterilmiştir (27). Görme aktivitesinin bu tetiklemeden sorumlu olduğunu düşündüren diğer bir bulgu da iç vasküler pleksusun optik sinir merkezli gelişmesine rağmen dış vasküler pleksusun en yüksek nöronal aktivitenin yüksek olduğu fovea çevresinde gelişmesidir. (47, 58, 74, 87). Behzadian ve arkadaşları 6-8 günlük Long-Evans sıçan retinalarından izole edilen Müller hücrelerinin kültür ortamında hipoksiye cevap olarak VEGF ve TGF- β salgılayabildiklerini ve TGF- β salgısının VEGF mRNA

ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir (5). Bu, hipoksinin hipotezde öne sürülen şekilde bir prosesi başlatmak konusundaki yeterliğini göstermektedir.

VEGF ve VEGF-B'nin 10. günde birlikte zirve yaptıkları izlenmiştir. Bu sinir lifi tabakasında (iç vasküler pleksus) damarlanmanın bitişi ve 7. günde iç nükleer tabakadaki (dış vasküler pleksus) damarlanmanın buna eklendiği dönem içindedir ve neonatal farede göz açma ile uyumludur (21,92). Artış bulgusunu destekleyecek şekilde (VEGF ekspresyonunu arttıran) EGF'in VEGF zirvesinden 2 gün önce (Flt-1 reseptörü ile eşin zamanlı) zirve yapmaktadır. Aynı şekilde VEGF ekspresyonunu arttırdığı bilinen TGF- β , TNF- α büyüme faktörleri ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS), siklooksijenaz tip-2 (COX-2) enzimlerinin VEGF ile eşin zamanlı olarak zirve yapmış olmaları ilgi çekicidir (43). VEGF reseptörü olan Flt-1'in 8. günde zirve yapmış olması bu yolağın 10. gündeki dalgadan daha önce harekete geçmiş olabileceğini düşündürmektedir. VEGF'in anjiyogenezin başlamasında en önemli faktör olduğu göz önünde bulundurulursa bu şartırcı değildir (15, 43, 93). Neurophilin (Nrp-1) ko-reseptörünün Flk-1 reseptörüne VEGF bağlanmasını arttırdığı bilinmektedir (43). Neurophilin'in (Nrp-1) 10. günde yalnız başına artmış olduğu gözlenir. Erişkin sıçanlarda Nrp-1'in nöronlar, glia ve endotel hücrelerinde iskemiye cevap olarak arttığı gösterilmiştir (55). Oysa Flk-1 (Nrp-1'in zirveye ulaştığı) bu dönemde yüksek değildir. Sadece (16. güne kadar sürecek olan) bir artışın ancak başındadır. Flk-1 reseptörü hemanjiyoplastin önce endotel hücre öncülerine ve sonuçta endotel hücrelerine dönüşmesinde önemli rol oynar (4, 15, 43, 93). Bu reseptör vaskülogenezin ve anjiyogenezin erken safhalarında etkilidir (4, 15, 43, 93). Flk-1 reseptörünün 16. günde zirve yapmış olması şartırcıdır. Angiopoietin-1'in yarışmalı inhibitörü olan angiopoietin-2 ve bu iki ligandın etkilerini gösterdikleri reseptör olan Tie-2'nin bu safhada VEGF ile birlikte zirve yapmaları beklenen bir bulgudur. VEGF ile birlikte angiopoietin-2 yükselmesi anjiyogenezin başlangıç aşamasında ilk izlenen olaylardan biridir (4, 15, 43, 93).

Endotel hücreleri için mitojenik oldukları bilinen ve pro-anjiyogenetik etkileri olan EGF ve TGF- α sırası ile 8 ve 10. günlerde zirve yapmışlardır. Bu iki faktörün de anjiyogenezin başlangıç döneminde aktif oldukları ve glial tümörlerdeki anjiyogenezde önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir (41, 43). TGF- α kavernomlar ve arteriovenöz malformasyonlarda da eksprese olur (54).

Ekstraselüler matriksin modülasyonu anjiyogenezin başlangıç fazında önemli basamaklardan biridir. Fibronektin ve onun reseptörü olan İntegrin-A5 (“Fibronectin Receptor- α ”) de bu dönemde zirve yaparlar. Tenascin-C de 10. günde zirve değerine ulaşır. Santral sinir sisteminin gelişiminde ve tümörlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiş olan tenascin molekülü integrinler ve annexin ile endotel hücrelerine tutunur ve çoğalma, migrasyon ve ekstraselüler matriks şekillendirilmesi gibi fonksiyonlarını kontrol eder (12, 31). Tenascin’in anjiyogenezi endotel hücrelerine tutunduğu integrin α - β 3 molekülü üzerinden kontrol ettiği gösterilmiştir (13). İntegrin β 3 10. günde anlamlı bir zirve yapar. Bazal laminadaki kollajen-4’ü yıkararak endotel hücrelerini serbestleyen Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) da 10. günde zirve yapmaktadır.

Bu çalışmada TGF- β 1 ligandı ve ALK-5 reseptör gen ekspresyonlarının 10. günde en yüksek değere ulaştıkları fakat (karşıt etkileri olan) endoglin ko-reseptörünün ise 16. günde yoğun eksprese olduğu gözlenmiştir. TGF- β ’nın kültüre edilmiş sıçan retinal Müller hücrelerinde hipoksi ile indüklenebildiği; sonuçta oluşan TGF- β artışının da VEGF ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (5). Dolayısıyla 10. gündeki TGF- β zirvesi, metabolik aktivite artışına bağlı rölatif hipoksinin anjiyogenezi indüklemesi hipotezi ile çelişmemektedir. TGF- β ’nın hem anjiyogenezin başlangıç hem de sonlanma basamaklarında rol aldığı düşünülürse endoglinin 16. günde yaptığı zirvenin de anjiyogenezin sonlanma basamağı ile ilgili olduğu düşünülebilir (38). Birçok çalışma TGF- β yolak aktivasyonunun bifazik etkilerini bildirmiştir (15, 38, 43, 69, 72). Aynı ligand aktivasyonunun anjiyogenezin hem başlangıç hem de sonlanma basamaklarında rol alabildiği gösterilmiştir ve bu etkinin TGF- β ’nın ALK-5 ya da ALK-1 reseptörleri üzerinden etki göstermesine bağlanmıştır (15, 38, 43, 69). Fakat hangi reseptörün hangi fazda etkili olduğu konusunda çelişkili raporlar vardır. ALK-1 “knock-out” hayvanların embriyoda 11.5 günde endotel hücresi sayısındaki artışa bağlı damar dilatasyonundan öldükleri gözlenmiş ve bundan ALK-1 yolağının anjiyogenezin sonlanma basamağından etkili olduğu sonucu çıkarılmıştır (68). Buna karşılık diğer bir grup da bifazik etkileri ALK-5 ve ALK-1 etkilerinin sırası ile yüksek ve düşük afinite reseptörleri olmaları ile açıklamış ve etkilerin konsantrasyon bağımlı olduğunu öne sürmüştür (38, 39). TGF betanın ALK-5 reseptörü üzerinden anjiyogenezi sonlandırma, ALK-1(endoglin de bu yönde etki göstermektedir) reseptörü üzerinden de anjiyogenezi başlatma yönünde etki gösterdiğini öne sürmüştür (38). İşi daha da karıştıracak şekilde TGF- β stimülasyonu ile

ilk olarak ALK-5 ve ALK-1 yollarının her ikisini de aktiflediği kısa süreli ALK-1 yanıtının sönerek zaman içinde yerini ALK-5'e terk ettiği düşüncesi de ortaya atılmıştır. Deneysel bulgularını yorumlamak da bu çelişkili teoriler nedeniyle zorlaşmaktadır. ALK-5 tarafından (SMAD-2 ve-3 ile) indüklendikleri düşünülen PAI-1 ve fibronektin; ALK-1 tarafından (SMAD-1,-2ve -5 ile) indüklendiği düşünülen thrombospondin genleri 10. günde eşzamanlı zirveler yapmışlardır (38, 88).

Anlamli düzeye ulaşmasalar da değinilmesi gereken TGF-β yolağı ile alakalı iki gen de TGFBR-2 ve ID-1'dir. Hem ALK5 hem de ALK-1 reseptörü ile dimer oluşturabilen TGFBR-2 ilginç bir şekilde ALK-5'in zirve değere ulaştığı 10. ve (ALK-1 yolağı ile çalışan) Endoglinin zirve yaptığı 16. günlerde belirgin şekilde artış göstermesine rağmen +2 standart sapma sınırını aşamamaktadır. ID-1 hücre döngüsünü kontrol ettiği bilinen bHLH (Basic Helix-loop helix) transkripsiyon faktörlerinin inhibitörüdür. ALK-1 sistemi ile aktive olduğu kabul edilen ID-1 10 ve 20. günlerde belirgin şekilde artmasına rağmen +2 standart sapma sınırını aşamamaktadır.

Hereditör hemorajik telenjektazi (Rendu Osler Weber) otozomal dominant kalıtılan ve yaşa bağıli penetrans gösteren, nazal, gastrointestinal ve serebral kanamalarla karakterize bir hastalıktır (42, 70). Özellikle serebral ve pulmoner damar yataklarında lokalize arteriovenöz malformasyonlarda karakterize hastalık genetik çalışmalar sonucunda Endoglin (HHT tip1) ve ALK-1 (6) (HHT tip2) genlerinde olan defektlere lokalize edilmiştir (42, 62, 71). İlk 20 günlük dönem boyunca izlediğimiz belirgin zirveler arasında TGF-β yolağının bulunması ilgi çekicidir. TGF-β, TGFβR-1 ya da TGFβR-2 homozigot "knock-out" hayvanlar yaygın vasküler anomalilerle embriyonal yaşamın erken safhalarında ölürlere (40). Buna karşılık homozigot endoglin "knock-out" hayvanlar vitellus kesesi ve kalpteki anomaliler nedeniyle ölürlere. Bu hayvanların vitellus kesesi haricindeki damar yapılarında belirgin defekt izlenmez. PECAM ekspresyonunun immunohistokimyasal incelenmesinde Endoglin "knock-out" hayvanların perinöral vasküler pleksus gelişiminde defektleri olduğu izlenmiştir. Embriyoda genel damarlanmada defekt olmaması, buna karşın perinöral vasküler pleksusun etkilenmesi endoglin eksikliğinin vaskülogenezi değil de anjiyogenezi etkilediğini düşündürür (86). Bu hayvanlarda vasküler düz kas hücresine ait proteinlerin eksikliği ve vitellus kesesinde damar organizasyonu yokluğu izlenmiştir. Bu Endoglin eksikliğinin anjiyogenezin sonlanma fazında perivasküler destek hücreleri (PC, SMC)

ile olan etkileşimin bozulmasına yol açtığını düşündürür (86). Bizim çalışmamızda Endoglinin 16. günde PDGF- β (PDGF-B ve PDGF- β gelişen damar ağının perivasküler destek hücreleri ile etkileşimini sağlar) ile birlikte zirve yaptığı izlenmiştir. 16. gün anjiyogenezin sonlanma dönemine karşılık gelmektedir. TGFBR-2'nin de anlamlı olmamakla birlikte 16. günde büyük bir zirve çizmesi bu dönemde TGF- β yolağının aktif olabileceğini düşündürmektedir. "Knock-out" hayvan modellerinden elde edilen bilgiler de TGF- β -ALK1 yolağının (Endoglin bu reseptör üzerinde etkisini gösterir) anjiyogenezin sonlanma basamağından etkili olduğu yönündedir (68). TGF- β 'nin vasküler endotel hücresi çoğalmasını ve göçünü engellediği gösterilmiştir (72). Bu etkiler bulgularımızla uyumludur.

7. SONUÇ

- C57 fare retinası pratik bir deney modelidir.
- Neonatal retina yapısı ve gelişimi serebral histoloji ve serebrovasküler gelişimle benzerlikler gösterir ve serebrovasküler gelişim modeli olarak kullanılabilir.
- Neonatal retinal gelişim sırasında 8, 10, 12, 16 ve 20. günlerde anjiyogenezde rol alan faktörlerde belirgin değişiklikler görülür.
- Onuncu günde en belirgin değişikliği gösteren genler anjiyogenezin başlangıç basamağında rol alan faktörlere aittir. Aynı şekilde 16. günde belirgin değişiklik gösteren genler ise anjiyogenezin sonlanma basamağında rol alan faktörlere aittir.
- Bu bulguların histolojik olarak derin retinal vasküler pleksusun gelişimi ile çakışması bu damar ağının anjiyogenez ile oluştuğu savını desteklemektedir.
- Yüzeysel vasküler pleksus hipoksi ve VEGF ekspresyonundan bağımsız bir mekanizma ile damarlanmaktadır. Bu gelişimin vaskülogenez ile olduğunu destekleyecek yeni kanıtlara ihtiyaç vardır.

TABLE 2
Deneý bulgularý

en ismi	0.gün	2.gün	4.gün	6.gün	8.gün	10.gün	12.gün	14.gün	16.gün	18.gün	20.gün	6 hafta
damts1	0,1971	0,076	0,1366	0,0163	0,0736	0,3628	0,1652	0,1146	0,1512	0,1143	0,2607	0,3312
damts8	0,1565	0,0431	0,1061	0,0103	0,037	0,2856	0,1285	0,0362	0,0789	0,0975	0,2797	0,3089
giopoietin-1	0,1257	0,0345	0,1164	0,0272	0,0506	0,2829	0,1265	0,0389	0,0884	0,061	0,332	0,3053
giopoietin2	0,1801	0,1288	0,2336	0,1152	0,1105	0,6808	0,1872	0,0632	0,1357	0,0464	0,417	0,3544
giogenin	0,1831	0,1435	0,246	0,1493	0,1566	0,4942	0,17	0,0632	0,137	0,0376	0,434	0,3551
D36	0,1068	0,1252	0,3236	0,1507	0,1144	0,6012	0,2	0,139	0,1453	0,03	0,5226	0,3067
dherin 5	0,2334	0,2388	0,384	0,275	1,1486	0,7839	0,2823	0,2008	0,2593	0,1752	0,5528	0,3909
isostatın/chromogranin A	0,6405	0,4626	0,6317	0,4879	1,0943	1,0083	0,6271	0,5949	0,6397	0,5207	0,802	0,9112
ocollagen, type XVIII, alpha	0,1678	0,0704	0,1	0,0001	0,074	0,2544	0,1305	0,0559	0,1227	0,0597	0,215	0,2706
-CSF	0,2098	0,0688	0,1648	0,0309	0,0909	0,421	0,1663	0,0848	0,1379	0,0722	0,3299	0,3166
ssue factor	0,2027	0,0646	0,2239	0,1023	0,1345	0,7191	0,2094	0,2263	0,2297	0,1175	0,5183	0,3418
ig1	0,173	0,1121	0,3721	0,1408	0,1431	0,7667	0,2382	0,2786	0,3025	0,1109	0,5186	0,4115
hrin A2	0,0971	0,1355	0,2249	0,1385	0,0978	0,361	0,1772	0,0883	0,1365	0,0365	0,3714	0,3004
hrin A receptor	0,4453	0,2727	0,3363	0,3245	0,3551	0,5954	0,2977	0,2745	0,2992	0,1431	0,5365	0,4386
hrin B2	0,2704	0,2633	0,2606	0,3167	0,1907	0,5447	0,2859	0,1829	0,2778	0,2296	0,5091	0,3762
doglin	0,1557	0,0408	0,1616	0,0312	0,0853	0,2391	0,2265	0,1768	0,3861	0,0891	0,2764	0,2513
hrin B4	0,3555	0,1726	0,4283	0,2029	0,2708	0,7345	0,1643	0,1634	0,3653	0,0668	0,4038	0,3268
b-2	0,1115	0,0148	0,1647	0,0898	0,0693	0,3311	0,1645	0,075	0,1115	0,0574	0,3502	0,3087
ets1	0,2044	0,1357	0,2644	0,2024	0,1134	0,2764	0,3509	0,2027	0,3888	0,1505	0,4518	0,356
othrombin kringle-1	0,0954	0,0812	0,2018	0,1729	0,0997	0,3794	0,1498	0,097	0,1299	0,0587	0,3544	0,2378
GF	0,0998	0,1353	0,2512	0,2222	0,1446	0,4988	0,1425	0,2165	0,1571	0,1494	0,5355	0,3481
3F16	0,5035	0,5224	0,4654	0,5097	0,7307	0,9951	0,1169	0,3193	0,3137	0,2048	0,6143	0,4097
GF	0,1352	0,0524	0,0729	0,0157	0,063	0	0,1491	0,0782	0,1121	0,0648	0,1258	0,205
3F4	0,2105	0,0804	0,2159	0,0656	0,2057	0,3257	0,289	0,2294	0,2336	0,1614	0,3236	0,3909
3F6	0,139	0,0769	0,1986	0,1071	0,1634	0,3744	0,1959	0,1241	0,2493	0,0923	0,2188	0,3677
3F7/KGF	0,5091	0,2488	0,6208	0,4991	0,779	0,9229	0,4761	0,4358	0,5733	0,3537	0,6445	0,7936
3FR1 (FLG)	1,1494	0,8886	1,0316	0,9918	1,8851	1,0394	1,0318	1,025	1,1439	1,179	0,9822	1,625
3FR3	0,1712	0,1011	0,2753	0,2292	0,1082	0,4464	0,208	0,2548	0,2075	0,1903	0,4929	0,2947
3FR4	0,0931	0,1263	0,2307	0,2149	0,0826	0,4721	0,0992	0,1369	0,1226	0,0646	0,4613	0,2199
EGF-D/FIGF	0,0522	0,0889	0,1852	0,1771	0,0702	0,3508	0	0,1197	0,0598	0,0351	0,3792	0,2349
DR	0,4407	0,4565	0,3034	0,2756	0,3543	0,363	0,5282	0,5494	0,6621	0,379	0,3401	0,551
EGFR	1,1232	0,827	0,9947	0,8995	1,919	1,0625	0,964	1,0172	1,1452	1,1383	0,8775	1,5968
i1	0,1928	0,0887	0,2361	0,1352	0,103	0,552	0,2022	0,1754	0,2093	0,0722	0,1901	0,2257
o1	0,063	0	0,143	0,1325	0,0533	0,2622	0,1437	0,0576	0,097	0,064	0,1933	0,2003
3F	0,1542	0,0641	0,1557	0,2848	0,102	0,2346	0,4011	0,2981	0,4145	0,4345	0,5311	0,3784
fla	0,7586	0,7344	0,6232	0,9458	1,0312	0,7935	0,9721	1,0065	1,0456	1,1187	0,9418	1,3769
o1	0,0629	0,1186	0,187	0,2575	0,1007	0,414	0,1293	0,192	0,0967	0,1066	0,4121	0,1725
o3	0,0911	0,351	0,2345	0,4584	0,4695	0,7227	0,1283	0,3883	0,3425	0,0887	0,5019	0,3169
NA1	1,0441	0,84	0,9326	0,5644	1,913	1,0799	0,5501	0,6191	0,9129	0,5187	0,6403	1,0984
N-b1	0,3766	0,155	0,2232	0,2088	0,6036	0,7278	0,2411	0,2132	0,2524	0,0925	0,2647	0,2284
N r	0,9103	0,6667	0,9498	0,8187	1,4533	1,075	0,4537	0,7624	0,8284	0,2278	0,7482	0,6956
iF-1	0,2066	0,1984	0,3956	0,3904	0,4209	0,7223	0,3268	0,3954	0,6264	0,1568	0,4294	0,2777
-10	0,0177	0,0089	0,1423	0,1501	0,0645	0,1657	0,1088	0,0467	0,0602	0,029	0,1892	0,119
-12A	0,0355	0,0707	0,1265	0,2198	0,0746	0,3141	0,1529	0,0809	0,0708	0,0498	0,2719	0,1155
tegrin a5	0,0298	0,0837	0,1493	0,1885	0,1073	0,368	0,1299	0,1006	0,0472	0,0333	0,3066	0,1215
tegrin aV	0,0356	0,1149	0,1681	0,2311	0,105	0,3281	0,1607	0,2821	0,1266	0,1055	0,4109	0,1913
o61	0,1447	0,0563	0,1249	0,0077	0,1143	0,3788	0,1939	0,0796	0,1358	0,0582	0,1491	0,0982
adh1	0,0969	0,0242	0,1094	0,028	0,0704	0,2059	0,2231	0,0727	0,1103	0,0696	0,1773	0,1031
idkine	0,1968	0,1461	0,1936	0,1578	0,0788	0,492	0,2214	0,0899	0,1139	0,0518	0,2267	0,1181
latinase A	0,0088	0,0183	0,1262	0,1265	0,0459	0,0486	0,1101	0,0475	0,0664	0,031	0,1184	0,099
latinase B	0,0908	0,1527	0,3816	0,2233	0,3808	0,5866	0,1545	0,1889	0,2609	0,065	0,4332	0,1907
-A	0,9809	0,8632	0,5435	0,8292	1,7773	1,0652	0,5609	0,6552	0,6564	0,3454	0,7241	0,8095
OS3	0,2832	0,2609	0,3601	0,4654	0,4302	0,879	0,2654	0,3931	0,2337	0,1407	0,6541	0,3641
uropilin	0,0307	0,1114	0,1611	0,2106	0,121	0,3894	0,1253	0,1574	0,0176	0,0373	0,3368	0,1592
GF a	0,0743	0,0537	0,0891	0,0111	0,0245	0,2219	0,197	0,0686	0,3151	0,0803	0,0892	0,0538
GF b	0,0398	0,0258	0,0732	0,0023	0,0903	0,0934	0,1633	0,0001	0,077	0,0503	0,0623	0,0225
GF Ra	0,0573	0,0909	0,1226	0,0717	0,2067	0,2584	0,2149	0,0477	0,1059	0,0389	0,1306	0,0717
GF Rb	0,0155	0,0395	0,1227	0,1355	0,1584	0,1188	0,1828	0,1198	0,2831	0,064	0,2125	0,0944

Büyüme faktörü ailesi	Aktivatörler	İnhibitörler	Lokalize olduğu hücre tipi	Bilgiler	Uni gene numarası	Genebank numarası
VEGF ailesi	VEGF (Vegf-A)		Astrosit/ Muller hücresi	Ana ligand, Alternate splicing sonucu 4 izoform (en sık VEGF165) VEGF ile %44 homoloji; EC üzerinde mitojenik Kalp ve iskelet kasında primer form Beyinde devamlı(constitutive) salınır, Kan Beyin Bariyeri devamlılığında rol alır VEGF ile %30 homoloji; Lenfatik sisteme spesifik	Mm.31540	M95200
	VEGF-B				Mm.15607	U48800
	VEGF-C				Mm.1402	U73620
	VEGF-D (VEGF)			"c-fos induced growth factor" Tümör anjiogenezinde önemli gliomlarda yüksek	Mm.3983	D89628
	Flt1 (VEGFR1)		EC	Vegf-A -B ve PGF tirozin kinaz reseptörü EC üzerine mitojenik etkili, migrasyon ve tüp oluşumunu sağlar, EC hayatta kalmasını sağlar	Mm.3464	L07297
	Flk1 (VEGFR2 / KDR)		EC Angioblast, hemangioblast	VEGF-A, -C ve -D için tirozin kinaz reseptörü; Hematopoez (vitelin kan adacığı oluşumu) Vasculogenez (Angioblast olgunlaşması) Anjiogenez(EC üzerine mitojenik etkili, migrasyon ve tüp oluşumunu sağlar, EC hayatta kalmasını sağlar)	Mm.285	X59397
	Neuropilin			Flk-1 ko-reseptörü;	Mm.27448	NM_008737
	PGF			Aksonal yönlendirmede etkili, nörotropik	Mm.4809	NM_008827
	Hif-1a			"Hypoxia inducible factor"; Hipoksiye sekonder VEGF salınımını sağlar	Mm.3879	NM_010431
Anjiopietinler	Ang1 (angiopoietin-1)		EC	Tie-2 üzerinden etkir; Damar ağının olgunlaştırır, VEGF bağılı vasküler permeabilite artışı geri döndürür	Mm.2550	U83509
	Agpt2 (angiopoietin-2)		EC	Ang-1'in kompetitif inhibitörü; Tie-2 ye bağlanması sonucunda sinyal oluşturmaz; VEGF varlığında vasküler ağı destabilize eder ve EC üzerine mitojenik etkir	Mm.3425	NM_007426
	Tek (tie-2)		EC	Ang-1 ve Ang-2 tirozin kinaz reseptörü	Mm.14313	D13738
	Tie		EC	tirozin kinaz reseptörü; ligand bilinmiyor	Mm.4345	X73960
PDGFA ailesi	PDGFA		Astrosit/ Muller hücresi	AA, AB ligand dimerleri yapabilir Astrositlere spesifik	Mm.2675	M29464

Tablo3: İncelenen büyüme faktörleri - sayfa 47

	PDGFB	SMC	AB, BB ligand dimerleri yapabilir; Perivasküler destek hücreleri için kemotaktik ve mitojenik	Mm.144089	AF162784
	PDGFR-α		Universal reseptör, Tirozin kinaz etkili dimerik reseptör AA, AB, BB dimerlerini tanıır	Mm.2924	NM_011058
	PDGFR-β	SMC/PC	Tirozin kinaz etkili dimerik reseptör, BB dimerlerini tanıır; Perivasküler destek hücreleri için kemotaktik ve mitojenik	Mm.4146	NM_008809
TGF-beta ailesi			(Platelet factor 4)	Mm.23905	AB017491
	TGF-β1	PF4 Bifazik etki Bkz; yazı	Homodimerik polipeptid Anjiyonez üzerinde bifazik etkili (bkz yazı)	Mm.9154	M13177
	TGF-β2	Bkz; yazı		Mm.18213	X57413
	TGF-β3	Bkz; yazı		Mm.1291	M32745
	TGFβR-1 (ALK-5)	Bkz; yazı	Serin/treonin kinaz reseptörü TGFβ tip 1 reseptörü	Mm.197552	D28526
TGFβR-2	Bkz; yazı	Serin/treonin kinaz reseptörü TGFβ tip 2 reseptörü	Mm.1377	NM_009371	
TGFβR-3 (betaglycan)	Bkz; yazı	"Betaglycan", Serin/treonin kinaz reseptörü	Mm.45644	AF039601	
Endoglin (CD105)	Bkz; yazı	ALK-1 ko-reseptörü, Eksikliği HHT sendromu tip 1'den sorumlu	Mm.4851	NM_007992	
Smad-1 (Madh1)	Bkz; yazı	TGF-β tarafından kullanılan hücre içi ikincil haberci sistemi, ALK-1 yolunda aktif	Mm.15185	NM_008539	
ID-1	Bkz; yazı	"Inhibitor of DNA binding" "Mouse helix-loop-helix DNA binding protein regulator" Transkripsiyon faktörü , TGFβ hedef geni	Mm.444	M31885	
ID-3	Bkz; yazı	"Inhibitor of DNA binding" "dominant negative helix-loop-helix protein" Transkripsiyon faktörü	Mm.110	NM_008321	
EGF/TGF-alfa ailesi	EGF	"Epidermal growth factor" VEGF salgısını artırır EC üzerine mitojenik Gliomlarda artar	Mm.1341	NM_010113	
	EGFR	Tirozin kinaz reseptörü Gliomlarda artar	Mm.8534	NM_007912	
	TGF-α	EGF ile %42 homoloji, EGFR reseptörüne bağlanır EC üzerine mitojenik, Gliomlarda artar	Mm.3992	U65016	

Tablo3: İncelenen büyüme faktörleri - sayfa 48

FGF ailesi	Fgf1 (aFGF)			Asidik FGF EC üzerine mitojenik, migrasyon ve tüp oluşumunu artırır, nörotrofik	Mm.5087	U67610
	Fgf2 (bFGF)			Bazık FGF EC üzerine mitojenik, migrasyon ve tüp oluşumunu artırır; VEGF ¹ indükler; nörotrofik	Mm.57094	M30644
	Fgf4				Mm.4956	M30642
	Fgf6				Mm.3403	M92416
	Fgf7				Mm.57177	U58503
	Fgf16				Mm.154768	NM_030614
	Fgfr1			Tirozin kinaz reseptörü	Mm.3157	M33760
	Fgfr3			Tirozin kinaz reseptörü	Mm.6904	M81342
	Fgfr4			Tirozin kinaz reseptörü	Mm.4912	NM_008011
Ephrin ailesi	Ephrin A2			VEGF sistemi ile bağıntılı	Mm.1478	NM_007909
	Ephrin-A5 (Ephrin-A receptor)			Ephrin-A tirozin kinaz reseptörü	Mm.7978	NM_010109
	Efnb2 (Ephrin B2)		Ateriyel EC	Embriyogenezde hücre dallanmasından sorumlu; Arteriyel kimlik belirleyicisi	Mm.4005	NM_010111
	Ephb4 (Ephrin B4)		Venöz EC	Venöz kimlik belirleyicisi	Mm.34533	NM_010144
Diğerleri			HGF	"Hepatocyte growth factor" " Scatter Factor " c-met protoonkogen'ine bağlanarak etkir EC proliferasyonu ve migrasyonunu indükler	Mm.15629	X84046
	Angiogenin				Mm.2566	U22516
			Vasostatin (chromogranin a)		Mm.4137	NM_007693
	Cd36			connective tissue growth factor	Mm.18628	NM_007643
	Ctgf				Mm.1810	NM_010217
	Edg1			"endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1"	Mm.982	NM_007901
	Igf1			"Insulin like growth factor"	Mm.2770	NM_010512
	Gro1			Onkogen	Mm.21013	J04596

Tablo3: İncelenen büyüme faktörleri - sayfa 49

Grup	Aktivatörler	Inhibitörler	Bilgiler	Unigene numarası	Genebank numarası
Yapı taşları	Procollagen 18a1		Vasküler bazal membrana spesifik	Mm.196000	NM_009929
	FN1 (fibronectin)			Mm.193099	M18194
	Tnc (Tenascin C)			Mm.980	NM_011607
Matris metalloproteinazları	MMP2		Matris metalloproteinaz-2 Ekstraselüler matris degradasyonunda önemli alfaVbeta3 integrine bağlanır	Mm.29564	NM_008610
	MMP9		Kollajen4'ü yıkar Bazal membran yıkılmasında önemli	Mm.4406	NM_013599
	Adams1			Mm.1421	NM_009621
	Adams8			Mm.100582	NM_013906
	Plau (uPA)		Ürokinaz fare homoloğu	Mm.4183	X02389
		Thbs1 (thrombospondin1)		Mm.4159	M87276
		Thbs2 (thrombospondin2)		Mm.26688	L07803
		Thbs3 (thrombospondin3)	"Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)"	Mm.2114	L24434
		Thbs4 (thrombospondin4)		Mm.20865	AF102887
		Timp1	"Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp2)"	MM.8245	NM_011593
		Timp2	"Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2)"	Mm.181969	0
		Serpine1 (PAI-1)	"Plasminogen activator inhibitor 1"	Mm.1263	M33960
		Serpine2 (PAI-2)	"Plasminogen activator inhibitor 2"	Mm.5019	X16490
		Serpib5		Mm.4622	NM_009257
		Serpinf1 (PEDF)		Mm.2044	AF017057
Adezyon molekülleri	Integrin alpha5		Integrin α zincir alt tipi	Mm.16234	NM_010577
	Integrin alphaV		Integrin α zincir alt tipi	Mm.4427	NM_008402
	Integrin beta3		Integrin β zincir alt tipi	Mm.8013	NM_016780
	Vcam1		"Vascular cell adhesion molecule"	Mm.1021	M84487
	Pecam (CD31)		"Platelet derived cell adhesion molecule"	Mm.2822	NM_008816
	Cdh5 (VE-Cadherin 5)		"Vascular endothelial Cadherin"	Mm.21767	NM_008868

Tablo 4: ekstraselüler matris ile ilişkili genler – Sayfa 50

Tablo 5: Deneyde incelenmiş olan, retinal anjiyogenezle alkalı sitokinler ve immün sistemle alkalı diğer genler

Grup	Aktivatörler	İnhibitörler	Etkisi bilinmeyen	Bilgiler	Unigene numarası	Genebank numarası
Büyüme faktörleri	TNF			"Tumor necrosis factor"	Mm.1293	NM_013693
	G-CSF			"Granulocyte colony stimulating factor"	Mm.1238	M13926
İnterferonlar		Ifna1		İnterferon-α	Mm.57127	NM_010502
		Ifnb		İnterferon β	Mm.1245	NM_010510
		Ifng (IFNg)		İnterferon γ	Mm.529	K00083
Sitokinler		Il10		İnterlökin 10	Mm.874	NM_010548
		Il12a		İnterlökin 12a	Mm.103783	M86672
Diğerleri			Mdk	"Midkine"	Mm.906	NM_010784
			Ptn (pleiotrophin)		Mm.3063	D90225
			Scya2	"small inducible cytokine A2 precursor"	Mm.145	NM_011333
			Sparc	"secreted acidic cysteine rich glycoprotein"	Mm.35439	NM_009242

Tablo 6: Diğer genler ve transkripsiyon faktörleri

İsim	Bilgiler	Unigene numarası	Genebank numarası
F2 (thrombin)	"Thrombin"	Mm.89048	NM_010168
Msr1	"Macrophage scavenger receptor"	Mm.1227	NM_031195
Ptgs1 (cox-1)	"Prostoglandin endoperoxide synthase"	Mm.2792	NM_008969
Ptgs2 (cox-2)	"Prostoglandin endoperoxide synthase"	Mm.3137	NM_011198
Spp1 (osteopontin)	"Secreted phosphoprotein"	Mm.321	NM_009263
Erb-2		erb-2	U71126
Ets-1	Anjiyogenetik anahtar "v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1(Ets-1)	Mm.14115	NM_011808

Tablo7: Gen ekspresyonlarının +2 standart sapmadan yüksek değerlere çıktıkları günlere göre dağılımı

8. günde zirve yapan genler (3 adet)	EGF flt-1 Cadherin-5
10. günde zirve yapan genler (31 adet)	VEGF VEGF-B Nrp-1 NOS-3 Cox-2 Angiopoietin-2 Tie-2 TGF- α TGF- β 1 ID-1 ID-3 ALK-5 Ephrin-B2 Ephrin-B4 Ephrin-A2 Ephrin-A5 Fibronectin Tenascin-c Integrin-A5 Integrin- β 3 MMP-9 Urokinase Thrombospondin-1 Thrombospondin-2 TIMP-1 PAI-1 PAI-2 PECAM-1 VCAM-1 G-CSF TNF- α IGF-1
12.günde zirve yapan genler (1 adet)	Pdgf-B
16. günde zirve yapan genler (4 adet)	Flk-1 PDGF-A PDGF- β Endoglin
20. günde zirve yapan genler (1 adet)	Integrin aV
Erişkinde zirve yapan genler (1 adet)	Hif-1A

8. KAYNAKLAR

1. Asahara T., Chen D., Takahashi T., Fujikawa K., Kearney M., Magner M., Yancopoulos G. D., Isner J. M.: Tie2 receptor ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ. Res.*, 83:233-240, 1998.
2. Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J. M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275:964-967, 1997.
3. Baev N. I., Awad I. A.: Endothelial cell culture from human cerebral cavernous malformations. *Stroke*, 29:2426-2434, 1998.
4. Baev N. I., Wong J. H., Awad I. A. Vasculogenesis and angiogenesis in relation to arteriovenous malformations of the brain. In: Yamada S., editor. *Arteriovenous malformations in functional areas of the brain*. Armonk, NY: Futura; 1999. p. 241-248.
5. Behzadian M. A., Wang X.-L., Shabrawey M., Caldwell R. B.: Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulating factors VEGF and TGF- β . *Glia*, 24:216-225, 1998.
6. Berg J. N., Gallione C. J., Stenzel T.: The activin receptor-like kinase 1 gene: Genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am. J. Hum. Genet.*, 61:60-67, 1997.
7. Boudreau N. J., Jones P. L.: Extracellular matrix and integrin signalling: The shape of things to come. *Biochem. J.*, 339:481-488, 1999.
8. Bourdeau A., Dumont D. J., Letarte M.: A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest.*, 104:1343-51, 1999.
9. Bourdeau A., Faughnan M. E., Letarte M.: Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Trends. Cardiovasc. Med.*, 10:279-85, 2000.
10. Breier G., Albrecht U., Sterrer S., Risau W.: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, 114:521-532, 1992.
11. Breier G., Clauss M., Risau W.: Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev. Dyn.*, 204:228-239, 1995.
12. Bronner-Fraser M.: Distribution and function of tenascin during cranial neural crest development in the chick. *J Neurosci Res*, 21:131-147, 1988.
13. Brooks P. C., Clark R. A., Cheres D. A.: Requirement of vascular Integrin α -v β 3 for angiogenesis. *Science*, 264:569-571, 1994.
14. Brooks P. C., Montgomery A. M., Rosenfeld M.: Integrin α b- β 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79:1157-1164, 1994.
15. Carmeliet P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6:389-395, 2000.
16. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G.: Abnormal vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature*, 380:435-439, 1996.
17. Chan-Ling T. L.: Glial, vascular, and neuronal cytogenesis in whole-mounted cat retina. *Microscopy Research and Technique*, 36:1-16, 1997.

18. Chan-Ling T. L., Gock B., Stone J.: The effect of oxygen on vasoformative cell division: Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 36:1201-1214, 1995.
19. Chan-Ling T. L., Halasz P., Stone J.: Development of retinal vasculature in the cat: Processes and mechanisms. *Curr. Eye Res.*, 9:459-478, 1990.
20. Chan-Ling T. L., Stone J.: Retinopathy of prematurity: Origins in the architecture of the retina. *Prog. Retinal. Res.*, 12:155-177, 1993.
21. Connolly S. E., Hores T. A., Smith L. E., D'Amore P. A.: Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvasc. Res.*, 36:275-290, 1988.
22. Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C., Yancopoulos G. D.: Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the tie-2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87:1161-1169, 1996.
23. de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L. T.: The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255:986-991, 1992.
- 23b. Deniz ML, Kılıç T, Almaata İ, Kurtkaya Ö, Özek MM, Sav A, Pamir MN: Expression of Growth Factors and Structural Proteins in Chordomas: b-FGF, TGF- α , and Fibronectin are Correlate with Recurrence. *Neurosurgery* 51: 753-760, 2002.
24. Diaz E., Y.H. Y., Ferreira T., Loh K. C., Okazaki Y., Hayashizaki Y., Tessier-Lavigne M., Speed T. P., Ngai J.: Analysis of gene expression in the developing mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:5491-5496, 2003.
25. Dorrell M. I., Aguilar E., Weber C., Friedlander M.: Global gene expression analysis of the developing postnatal mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45:1009-1019, 2004.
26. Drake C. J., Cheres D. A., Little C. D.: An antagonist of integrin α - β 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J. Cell. Sci.*, 108:2655-2661, 1995.
27. Dreher B., Robinson S. R.: Development of the retinofugal pathway in birds and mammals: Evidence for a common "timetable." *Brain Behav. Evol.*, 31:369-390, 1988.
28. Duckett S.: The establishment of internal vascularization in the human telencephalon. *Acta Anat.*, 80:107-113, 1971.
29. Dumont D. J., Gradwohl G., Fong G.-H., Puri M. C., Gertsenstein M., Auerbach A., Breitman M. L.: Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, TEK, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.*, 8:1897-1909, 1994.
30. Eliceiri B. P., Klemke R., Strömblad S., Cheres D. A.: Integrin α - β 3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol*, 140:1255-1263, 1998.
31. Erickson H. P., Bourdon M. A.: Tenascin: An extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Annu Rev Cell Biol*, 5:71-92, 1989.
32. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., S. O'Shea K., Powell-Braxton L., Hillan K. J., Moore M. W.: Heterozygous embryonic lethality induced by the targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380:439-442, 1996.

33. Ferrara, N.: Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* 55:15-35, 2000
34. Fong G. H., Rossant J., Gertsenstein M., Breitman M. L.: Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376:66-70, 1995.
35. Fruttiger M.: Development of the mouse retinal vasculature: Angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43:522-527, 2002.
36. Gale N. V., Yancopoulos G. D.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and Ephrins in vascular development. *Genes Dev.*, 13:1055-1066, 1999.
37. Golub T. R., Slonim D. K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J. P., H., Loh M. L., Downing J. R., Caligiuri M. A., Bloomfield C. D., Lander E. S.: Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286:531-7, 1999.
38. Goumans M.-J., Lebrin F., Valdimarsdottir G.: Controlling the angiogenic switch a balance between two distinct TGF-beta receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*, 13:301-307, 2003.
39. Goumans M.-J., Valdimarsdottir G., Itoh S.: Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type-1 receptors. *EMBO J*, 21:1743-1753, 2002.
40. Goumans M.-J., Zwijsen A., Van Rooijen M. A.: Transforming growth factor-beta signalling in extraembryonic mesoderm is required for yolk sac vasculogenesis in mice. *Development*, 126:3473-3483, 1999.
41. Grottendorst G. R., Williams B. W., Tekehara K., Charette M.: Egf and tgf-alpha are potent chemoattractants for endothelial cells and egf-like peptides are present at sites of tissue regeneration. *J Cell Physiol*, 139:617-623, 1989.
42. Guttmacher A. E., Marchuk D. A., White R. I.: Current concepts: Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N. Engl. J. Med.*, 333:918-924, 1995.
43. Harrigan M. R.: Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery*, 53:639-660, 2003.
44. Herken R., Gotz W., Wattjes K. H.: Initial development of capillaries in the neuroepithelium of the mouse. *J Anat.*, 164, 1989.
45. Herman J. M., Spetzler R. F., Bederson J. B., Kurbat J. M., Zabramski J. M.: Genesis of a dural arteriovenous malformation in a rat model. *J. Neurosurg.*:539-545, 1995.
46. Hocevar B. A., Brown T. A., Howe P. H.: Tgf-[beta] induces fibronectin synthesis through a c-jun n-terminal kinase-dependent, SMAD4 independent pathway. *EMBO J*, 18:1345-1356, 1999.
47. Hughes S., Huijun Yang H., Chan-Ling T. L.: Vascularization of the human fetal retina: Roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41:1217-1228, 2000.
48. Hughes S., Yang H., Chan-Ling T.: Vascularization of the human fetal retina: Roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:1217-1228, 2000.
49. Massague J.: TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791, 1998.
50. Jallo G. I., Friedlander D. R., Kelly P. J., Wisoff J. H., Grumet M., Zagzag D.: Tenascin-c expression in the cyst wall and fluid of human brain tumors correlates with angiogenesis. *Neurosurgery*, 41:1052-9, 1997.

51. Jiang B., Liou G. I., Behzadian M. A., Caldwell R. B.: Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: Effects on fibronectin expression. *J. Cell Sci.*, 107:2499-2508, 1994.
52. Jiang B., Liou G. I., Caldwell R. B.: Astrocytes modulate endothelial cell growth, differentiation and fibronectin expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 34(suppl):899, 1993.
53. Kawasaki T., Kitsukawa T., Bekku Y., Matsuda Y., Sanbo M., Yagi T., Fujisawa H.: A requirement for Neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 126:4895-4902, 1999.
54. Kilic T., Pamir M. N., Kullu S., Eren F., Ozek M. M., Black P. M.: Expression of structural proteins and angiogenic factors in cerebrovascular anomalies. *Neurosurgery*, 46:1179-1192, 2000.
- 54a. Kılıç T, Alberta J, Zdunek PR, Acar M, Iannarelli P, O'Reilly T, Buchdunger E, Black McL P, Stiles CD: Intracranial Inhibition on Platelet-derived Growth Factor-mediated Glioblastoma Cell Growth by an Orally Active Kinase Inhibitor of the 2-Phenylaminopyrimidine Class. *Cancer Research* 60, 5143-5150, 2000.
- 54b Kılıç T, Bayri Y, Özdoğan K, Acar M, Diren S, Kurtkaya Ö, Ekinci G, Buğra K, Sav A, M Özek MM, Pamir MN: Tenascin in Meningioma; Expression is Correlated with Anaplasia, VEGF Expression, and Peritumoral Edema but not with Tumor Border Shape, *Neurosurgery* 51:183-193, 2002.
55. Lennmyr F., Ata K. A., Funa K., Olsson Y., Terent A.: Expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its receptors(Flt-1 and flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57:874-882, 1998.
56. Leung D. W., Cachianes G., Klagsbrun W.-J., Goeddel D. V., Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246:1306-1309, 1989.
57. Leveen P., Pkny M., Gebre-Medhin S.: Mice deficient for PDGF-B show renal, and hematological anomalies. *Genes Dev.*, 8:1875-1887, 1994.
58. Linberg K. A., Fisher S. K.: A burst of differentiation in the outer posterior retina of the eleven-week human fetus: An ultrastructural study. *Vis. Neurosci.*, 5:43-60, 1990.
59. Lindahl P., Johansson B. R., Leveen P.: Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf b deficient mice. *Science*, 277:242-245, 1997.
60. Macdonald R. L.: Editorial comment on: (Stroke 1998;29:2426-2434) *Stroke*, 29:2434, 1998.
61. Maisonpierre P. C., Suri C., Jones P. F., Bartunkova S., Wiegand S. J., C., Compton D., McClain J., Aldrich T. H., Papadopoulos N., Daly T. J., Davis S., Sato T. N., Yancopoulos G. D.: Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277:55-60, 1997.
62. McAllister K. A., Grogg K. M., Johnson D. W.: Endoglin, a tgfbeta binding of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.*, 8:345-351, 1994.
63. Millauer B., Wizigmann-Voos S., Schnurch H., Martinez R., Moller N., Risau W., Ullrich A.: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 72:835-846, 1993.

64. Miller J. W., Adamis A. P., Shima D. T.: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.*, 145:574–584, 1994.
65. Mu X., Zhao S., Perhad R., Hsieh T., Scarpa A., Wang S. W., White R. A., Beremand P. D., Thomas T. L., Gan L., Klein W. H.: Gene expression in the developing mouse retina by est sequencing and microarray analysis. *Nucleic Acids Research*, 29:4893-4993, 2001.
66. Murata T., Nakagava K., Khalil A., Ishibashi T., Inomata H., Sueishi K.: The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates. *Lab. Invest.*, 74:68-77, 1996.
67. Noden D. M.: Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140, 1989.
68. Oh S. P., Seki T., Goss K. A.: Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci*, 97:2626-2631, 2000.
69. Oshima M., Oshima H., Taketo M. M.: Tgf-beta receptor type-II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.*, 179:297-302, 1996.
70. Osler W.: On a family form of recurring epistaxis of the skin and mucous membranes associated with multiple telangiectasias of the skin and mucous membranes. *Bull Johns Hopkins Hosp.*, 28:401-403, 1901.
71. Pece-Barbara N., Cymerman U., Vera S., Marchuk D. A., Letarte M.: Expression analysis of four Endoglin missense mutations suggests that haploinsufficiency is the predominant mechanism for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Hum Mol Genet*, 8:2171-81, 1999.
72. Pepper M. S.: Transforming growth factor-beta: Vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytok Growth Fact Rev*, 8:21-43, 1997.
73. Peters K. G.: Editorial: Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins: Working together to build a better blood vessel. *Circ Res*, 83:342–343, 1998.
74. Provis J. M., van Driel D., Billson F. A., Russell P.: Development of the human retina: Patterns of cell distribution and redistribution in the ganglion cell layer. *J. Comp. Neurol.*, 233:429–451, 1985.
75. Quinn T. P., Peters K. G., de Vries C., Ferrare N., Williams L. T.: Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:7533-7537, 1993.
76. Ramirez J. M., Trivino A., Ramirez A. I., Salazar J. J., Garcia-Sanchez J.: Immunohistochemical study of human retinal astroglia. *Vis Research*, 34, 1994.
77. Risau W.: Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 1997.
78. Robertson P. L., Du Bois M., Bowman P. D., Goldstein G. W.: Angiogenesis in developing rat brain: An in vivo and in vitro study. *Brain Res*, 355:219-223, 1985.
79. Satomi J., Mount R. J., Toporsian M., Paterson A. D., Wallace M. C., Harrison R. V., Letarte M.: Cerebral vascular abnormalities in a murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Stroke*, 34:783-9, 2003.
80. Schena M., Shalon D., Davis R. W., Brown P. O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270:467-70, 1995.

81. Shalaby F., Ho J., Stanford W. L., Fischer K.-D., Schuh A., C. , Schwartz L., Bernstein A., Rossant J.: A requirement for *flk1* in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, 89:981-990, 1997.
82. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T. P., Gertsenstein M., Wu X. F., Breitman M. L., Schuh A. C.: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *flk1*-deficient mice. *Nature*, 376:62-66, 1995.
83. Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikeda T., Tojo A., Matsushima H., Sato M.: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (*flt*) closely related to the *fms* family. *Oncogene*, 5:519-524, 1990.
84. Soriano P.: Abnormal kidney development and hematologic disorders in *pdgfr* beta receptor mutant mice. *Genes Dev*, 8:1888-1896, 1994.
85. Suri C., Jones P. F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpiere P. C., Davis S., Sato T. N., Yancopoulos G. D.: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the *tie-2* receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87:1171-1180, 1998.
86. van den Driesche S., Mummery C. L., Westermann C. J. J.: Hereditary hemorrhagic telangiectasia: An update on transforming growth factor b signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 58:20-31, 2003.
87. van Driel D., Provis J. M., Billson F. A.: Early differentiation of ganglion, amacrine, bipolar, and muller cells in the developing fovea of human retina. *J. Comp. Neurol.*, 291:203-219, 1990.
88. Visser J. A., Themmen A. P. N.: Downstream factors in transforming growth factor-b family signaling. *Mol. Cel. Endocrinol.*, 146:7-17, 1998.
89. Wautier M.-P., Boval B., Chappey O., Enjolras O., Wernert N., Merland J. J., Wautier J. L.: Cultured endothelial cells from human arteriovenous malformations have defective growth regulation. *Blood*, 94:2020-2028, 1999.
90. Yang S., Xin X., Zlot C., Ingle G., Fuh G., Li B., Moffat B., deVos A. M., Gerritsen M. E.: Vascular endothelial cell growth factor-driven endothelial tube formation is mediated by vascular endothelial growth factor receptor-2: A kinase insert domain containing receptor. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 21:1934-1940, 2001.
91. Yi X., Mai C.-L., Uyama M., Yew D. T. W.: Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp. Brain. Res.*, 118:155-160, 1998.
92. Yi X., Mai L. C., Uyama M., Yew D. T.: Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp. Brain. Res.*, 118:155-60, 1998.
93. Zadeh G., Guha A.: Angiogenesis in nervous system disorders. *Neurosurgery*, 53:1362-74; discussion 1374-6, 2003.
94. Zhang Z. G., Zhang L., Jiang Q., Chopp M.: Bone marrow derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ. Res.*, 90:284-288, 2002.

9. ÖZGEÇMİŞ

8.11.2004

KORAY ÖZDUMAN

Doğum tarihi : 15 Kasım 1973

İş adresi : Marmara Üniversitesi Hastanesi
Nöroşirürji ABD, Kat 3
Altunzade 81190 Türkiye

Telefon : 0216 - 326 45 59 Faks: 0216 - 327 52 49

Ev Adresi : Acıbadem, Hukukçular sitesi,
H-blok, Daire 6,
Kadıköy 81070 Türkiye

Telefon : 0216-5454058 E-posta: koray.ozduman@superonline.com

EĞİTİM BİLGİLERİ:

İlkokul : *Şişli Terakki Lisesi İlkokulu (1979-1984)*

Orta Öğrenim : *StGeorge Avusturya Lisesi (1984-1992)*

Üniversite : *İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi (1992-1998)*

Uzmanlık eğitimi : *Marmara Üniversitesi Nöroşirürji ABD (1999-2004)*

Yabancı Diller : Almanca, İngilizce

YURTDIŞI YAYINLAR:

1. Applegate CD, Samoriski GM, *Ozduman K.* Effects of valproate, phenytoin, and MK-801 in a novel model of epileptogenesis. Epilepsia. 1997 Jun;38(6):631-6.
2. Pamir MN, *Ozduman K.* Elmacı I. Spinal hydatid disease. Spinal Cord. 2002 Apr;40(4):153-60. Review.
3. Kılıc T, Bayrı Y, *Ozduman K.* Acar M, Diren S, Kurtkaya O, Ekinci G, Buğra K, Sav A, Özek MM, Pamir MN.

Tenascin in meningioma: expression is correlated with anaplasia, vascular endothelial growth factor expression, and peritumoral edema but not with tumor border shape.

Neurosurgery. 2002 Jul;51(1):183-92; discussion 192-3.

4. Kilic T, Ozduman K, Elmaci I, Sav A, Pamir MN
Effect of surgery on tumor progression and malignant degeneration in hemispheric diffuse low-grade astrocytomas.
J Clin Neurosci. 2002 Sep;9(5):549-52.
5. Pamir MN, Ozduman K
Primary hypophysitis: Idiopathic Inflammatory disorders of the pituitary gland
Neurosurgery Quarterly 2002 12(3);197-215. Review
6. Türe U, Ozduman K, Elmaci I, Pamir MN.
Infratentorial lateral supracerebellar approach for trochlear nerve schwannoma.
J Clin Neurosci. 2002 Sep;9(5):595-8.
7. Anderson RC, Connoly ES, Ozduman K, Laurans MSH, Gunel M, Khandji A, Faust PL, Sisti MB
Clinicopathological review: Giant intraventricular cavernous malformation
Neurosurgery 2003 53:374-379.
8. Ozduman K, Pober BR, Barnes P, Copel JA, Ogle EA, Duncan CC, Ment LR.
Fetal stroke.
Pediatr Neurol. 2004 Mar;30(3):151-62.
9. Cohen-Gadol AA, Ozduman K, Bronen RA, Kim JH, Spencer DD.
Long-term outcome after epilepsy surgery for focal cortical dysplasia.
J Neurosurg. 2004 Jul;101(1):55-65.
10. Peker S, Ozduman K, Kilic T, Pamir MN
Relief of hemifacial spasm after radiosurgery for intracanalicular vestibular schwannoma
Minim Invas Neurosurg 2004; 47:235-237
11. Pamir MN, Kilic T, Ozduman K, Türe U
Experience of a single institution treating foramen magnum meningiomas
J Clin Neurosci. 2004 Nov;11(8):863-867.

YURTIÇI YAYINLAR:

1. Çurgunlu S, Hacıoğlu M, Ercan S, Özduman K, Tekeş A, Sarısoy HT, üzüm G, Diler AS, Altuğ T, Büyükdevrim AS
Akut nikotinle oluşturulan epilepsi: Kan beyin bariyeri ve beyin dokusu spesifik gravite değerleri
Ege Tıp Dergisi 1994, 33(1-2) 21-23

YURTDIŞI KONGRE BİLDİRİLERİ

1. Pamir MN, Kılıç T, Özduman K, Özek MM
Surgical Results of Cavernous Sinus Exploration for Non-meningeal Tumours",
12th European Congress of Neurosurgery, European Association of Neurological
Societies (EANS), Lisboa-Portugal, September 7-12, 2003.

YURTIÇI KONGRE BİLDİRİLERİ

1. Kılıç T, Bayrı Y, Özduman K, Özek MM, Pamir MN,
Meningiomalarda tenascin ekspresyonu ve klinik önemi
TND 15. Bilimsel kongresi Antalya, Mayıs 2001.
2. Özduman K, Kılıç T, Elmacı İ, Özek MM, Sav A, Pamir MN
Supratentorial hemisferik düşük gradeli diffüz astrositomlarda total rezeksiyonla
stereotaktik biopsinin karşılaştırılması
TND 15. Bilimsel kongresi Antalya, Mayıs 2001.
3. Sun HI, Kılıç T, Özduman K, Kurtkaya Ö, Yıldırım Ö, Sav A, Pamir MN
Kraniofaringeomlarda FGF-2 fibronektin ve VEGF ekspresyonu
3. Ulusal Sinirbilim Kongresi Denizli, 7-11 Nisan, 2004.
4. Güçlü B, Özduman K, Kılıç T, Kurtkaya Ö, Pamir MN
Serebrovasküler malformasyonlarda matrix metalloproteinazların
immunohistokimyasal olarak gösterilmesi
3. Ulusal Sinirbilim Kongresi Denizli, 7-11 Nisan, 2004.
5. Kılıç K, Özduman K, Kılıç T, Konya D, Yıldırım Ö, Kurtkaya Ö, Pamir MN
Gamma Knife'ın arteriovenöz malformasyonlar üzerindeki etkisinin dinamik
eksperimental modelle gösterilmesi
3. Ulusal Sinirbilim Kongresi Denizli, 7-11 Nisan, 2004.
6. Kılıç T, Peker S, Özduman K, Ağan K, Midi İ, Aykut-Bingöl C, Pamir MN
Hipokampal Lezyonu ve Nöbetleri olan Hastada Gamma-Knife Işın Tedavisinin
Sonuçları
4. Ulusal Epilepsi Kongresi 9-12 Haziran, Ankara, 2004.
7. Kılıç T, Peker S, Özduman K, Ağan K, Midi İ, Aykut-Bingöl C, Pamir MN
Serebral Arteriovenöz Malformasyonların Gamma-Knife Tedavisi Sonrasında
Nöbet Sonuçları
4. Ulusal Epilepsi Kongresi 9-12 Haziran, Ankara, 2004.



**MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU**

PROJENİN ADI : C57 fare modelinde neonatal retinal vasküler gelişimin anjiogenetik büyüme faktörleri açısından analizi: Serebrovasküler gelişim deney modeli oluşturulması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Dr. Koray ÖZDUMAN
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Doç. Dr. Türker KILIÇ-
PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü.Nörolojik Bilimler Enstitüsü
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 29.09.2004- 54. 2004.mar

Sayın : Dr. Koray ÖZDUMAN

Deneysel Hayvanlar Araştırma Etik Kurulu'na "C57 fare modelinde neonatal retinal vasküler gelişimin anjiogenetik büyüme faktörleri açısından analizi: Serebrovasküler gelişim deney modeli oluşturulması" isimli proje ile yapmış olduğunuz başvurunuz, "Deneysel Hayvanlar Araştırma Etik Kurulu" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç.Dr. M.Zafer Gören

**Deneysel Hayvanlar Araştırma Etik Kurulu
Yürütücü Sekreteri**

Fikir Belirtenler

Prof. Dr. Özdemir AKTAN
Prof. Dr. Berrak YEĞEN
Doç. Dr. Zafer GÖREN
Araşt. Gör. Gürkan SERT
Vet.Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Not: Deneysel hayvanların yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, "Deneysel Hayvanlar Araştırma Etik Kurulu'na" bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir.