



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDİATRİK HEMATOLOJİ BİLİM DALI

HİPOKSİK EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE
ERİTROPOİETİN UYGULAMASININ EMBRİYO
GELİŞİMİ VE BEYİN VEGF RESEPTÖR
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasemin ALTUNER TORUN

KAYSERİ-2008



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDIATRİK HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**HİPOKSİK EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE
ERİTROPOİETİN UYGULAMASININ EMBRİYO
GELİŞİMİ VE BEYİN VEGF RESEPTÖR
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Yasemin ALTUNER TORUN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet Akif ÖZDEMİR**

KAYSERİ-2008

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	I
KISALTMALAR.....	II
TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
RESİM LİSTESİ.....	V
EK TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	V
ÖZET.....	VI
ABSTRACT.....	IX
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	3
<i>İN VİTRO</i> SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ	3
<i>In Vitro</i> Kültür Sistemlerinin Önemi	4
Embriyolarda <i>In Vitro</i> Büyüme ve Gelişmenin Değerlendirilmesi	4
EMBRİYONİK GELİŞİM	7
Erken Dönem Embriyonik Siçan Gelişimi	7
Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişim	8
ERİTROPOİETİN	9
Eritropoietinin Etki Mekanizması	9
EPO Salınımının Oksijen-Bağımlı Düzenlenmesi	11
ERİTROPOİETİNİN SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDEKİ ROLÜ	14
Beyinde EPO ve EPO Reseptör Salınımı	14
EPO ve Kan-Beyin Bariyeri	15
EPO'nun Nöron Koruyucu Etkileri ve Fیزیopatolojisi	16
EPO'nun Klinik Uygulamaları	19

VASKÜLER ENDOTEL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)	20
VEGF'in Yapısı	21
VEGF'in Vücutta Dağılımı ve Ekspresyonu	22
VEGF'in Etkileri	23
VEGF'in Reseptörü Üzerine Etkileri	25
VEGF'in Beyin Üzerindeki Etkileri	26
VEGF İLE EPO İLİŞKİSİ	27
GEREÇ VE YÖNTEM	30
DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ	30
ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	31
EMBRİYO KÜLTÜRÜ	31
Kültür Ortamının (Serum) Hazırlanması	31
Embrioların Anne Karnından Çıkarılışı ve Kültürü	33
Embriyoda Hipoksi Oluşturulacak Gaz Karışımının Belirlenmesi	37
Embriyoya Verilecek rHuEPO Dozunun Belirlenmesi	37
EMBRİYO BEYİN DOKUSUNUN EKSTRAKİYONU VE REAL- TİME RT-PCR İLE VEGFR-1, VEGFR-2 VE VEGFR-3 MRNA EKSPRESYONLARININ TESPİTİ	38
BULGULAR	41
TARTIŞMA	52
SONUÇLAR	63
KAYNAKLAR	65
EKLER	75

TEŞEKKÜR

Pediyatrik Hematoloji uzmanlık eğitimim süresince;

- ✓ Gerek çalışma disiplinleri gerekse akademik yaklaşımları ile örnek aldığım değerli hocalarım başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Akif ÖZDEMİR olmak üzere Sayın Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Musa KARAKÜKCÜ'ye,
- ✓ Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD'den tüm hocalarıma ve birlikte çalıştığım değerli yan dal ve pediatri araştırma görevlilerine,
- ✓ Tez çalışması sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Harun ÜLGER'e, Mehtap HACIALİOĞULLARI'na
- ✓ DEKAM çalışanlarına,
- ✓ Tıbbi Genetik Anabilim Dalında çalışmakta olan uzman biolog Hilal AKALIN ve Müge G. ÖNAL'a,
- ✓ Her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili AİLEME,

Teşekkür ediyorum, şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Yasemin ALTUNER TORUN

KISALTMALAR

BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EPO	: Eritropoietin
EPO-R	: Eritropoietin Reseptörü
FIH	: HIF İnhibe Eden Faktör
Flk-1	: Fetal Liver Kinaz (VEGFR-2)
Flt-1	: Felin Sarkom virüs benzeri tirozin kinaz (VEGFR-1)
HIF	: Hipoksi İnducible Faktör
IL	: İnterlökin
KDa	: Kilo Dalton
NO	: Nitrik Oksit
RT-PCR	: Real time- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIGF	: Plasenta Büyüme Faktörü
rHuEPO	: Rekombinan İnsan Eritropoietini
SSS	: Santral Sinir Sistemi
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör

TABLO LİSTESİ

		Sayfa
		<u>No</u>
Tablo I	Santral sinir sisteminde EPO ve EPO reseptör salınım bölgeleri	15
Tablo II	Gruplara göre normal dağılım gösteren morfolojik skorlama verileri	43
Tablo III	Gruplara göre normal dağılım göstermeyen morfolojik skorlama verileri	46
Tablo IV	Kontrol grubu ile deney grubunun beyin gelişimi	47
Tablo V	Kontrol grubu standart alındığında VEGFR ekspresyon verileri	55
Tablo VI	Hipoksi grubu standart alındığında VEGFR ekspresyon verileri	49
Tablo VII	VEGFR-3 ile ilişkili parametreler	51

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa
		<u>No</u>
Şekil 1	EPO'nun reseptörüne bağlanması ile gelişen olaylar zinciri	10
Şekil 2	EPO ve EPO reseptörünün apoptozis üzerine etkileri	10
Şekil 3	Hipokside ve normal oksijen seviyelerinde HIF regülasyonu	13
Şekil 4	Nöronlarda EPO ile VEGF ilişkisi	28
Şekil 5	Merkezi sinir sistemindeki hipoksinin uyardığı nöronal koruma mekanizmaları	29
Şekil 6	GAPDH ve VEGFR PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	39
Şekil 7	Grupların total morfolojik skor değerleri	44
Şekil 8	Grupların somit sayısı değerleri	44
Şekil 9	Ortalama vitellus kesesi çapının gruplardaki değerleri	45
Şekil 10	Grupların baş-kıç uzunluğu değerleri	45
Şekil 11	Grupların beyin skoru değerleri	47
Şekil 12	VEGFR ekspresyonlarının kontrol ve hipoksi grubundaki değerleri	48
Şekil 13	VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri	49
Şekil 14	VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri	50
Şekil 15	VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri	50

RESİM LİSTESİ

		Sayfa <u>No</u>
Resim 1	Dişi ve erkek sıçanlardan serum için kan alımı	32
Resim 2	Gebe sıçanlardan embriyoların çıkarılışı.	33
Resim 3	Oksijen tüpleri ve lamin-air flow	34
Resim 4	Embriyoların ekstraembriyonik dokudan çıkarılışı	35
Resim 5	Embriyolara gaz verilmesi	36
Resim 6	Roller inkübatör	36
Resim 7	Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük sıçan embriyoları	42
Resim 8	Hipoksi sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları	42
Resim 9	Kültür ortamına 50 ve 100Ü/ml EPO ilave edildikten sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları	42

EK TABLO-ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa <u>No</u>
Ek tablo I	Kontrol grubunun morfolojik skorlama verileri	75
Ek tablo II	Hipoksi grubunun morfolojik skorlama verileri	76
Ek tablo III	EPO1 grubunun morfolojik skorlama verileri	77
Ek tablo IV	EPO2 grubunun morfolojik skorlama verileri	78
Ek tablo V	EPO3 grubunun morfolojik skorlama verileri	79
Ek Şekil 1	Morfolojik skor tablosu	80

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada sıçan embriyo kültüründe hipoksinin nörogenezis ve anjiogenezis üzerine olan olumsuz etkisinin eritropoietin (EPO) ile değişimi ve EPO-vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem ve Gereçler: Çalışma biri kontrol dördü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup üzerinde gerçekleştirildi. Kontrol grubunda sadece Whole rat serum (WRS: total rat serumu) kullanıldı. Hipoksi grubu WRS'deki embriyolara hipoksi (1. ve 2. gün %5, 3. gün %40 oranında O₂ içeren gaz karışımı) uygulandı. Hipoksi oluşturulan embriyoların ortamına EPO1 grubunda 200Ü/ml, EPO2 grubunda 100Ü/ml, EPO3 grubunda 50Ü/ml rekombinan insan eritropoietini (rHuEPO) ilave edildi.

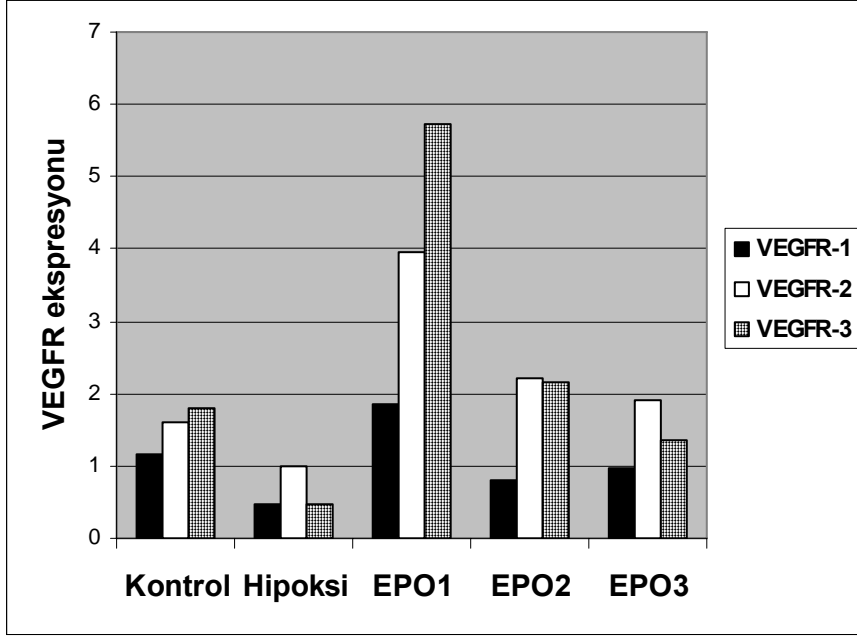
Kontrol grubuna hipoksi oluşturulmadı ve EPO verilmedi. Morfolojik skorlama sistemine göre 11,5 günlük embriyoların gelişimleri mikroskop altında değerlendirildi. Embriyo beyin dokusunun ekstraksiyonunda real-time RT-PCR ile VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 mRNA ekspresyonları tespit edildi.

Bulgular: Toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı esas alınarak yapılan morfolojik skorlama değerlendirmesinde kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü ($p < 0.05$, Tablo).

Değişkenler	Kontrol (n:10)	Hipoksi (n:10)	Hipoksi+EPO grubu			P değeri
			EPO1 (n:10)	EPO2 (n:10)	EPO3 (n:9)	
Total morfolojik skor	55.30±7.22	23.0±4.61 a	36.20±5.07 a,b	19.70±5.07 a,c	28.10±13.5 a	<0.05
Somit sayısı	22.10±3.78	10.30±3.59 a	15.29±2.30 a,b	8.10±2.55 a,c	11.56±5.70 a	<0.05
Ortalama Vitellus kesesi çapı	5.70±0.38	5.08±0.66	4.36±1.20	5.02±0.85	4.70±0.54 a	<0.05
Baş-kıç uzunluğu	4.84±0.63	2.78±0.58 a	2.69±0.41 a	2.48±0.33 a	2.91±0.46 a	<0.05

a p<0.005; kontrol grubu ile kıyaslandığında **c** p<0.005; EPO1 grubu ile kıyaslandığında
b p<0.005; hipoksi grubu ile kıyaslandığında

VEGF reseptörü 1 (VEGFR-1), VEGFR-2, VEGFR-3 ekspresyonları açısından bakıldığında kontrol grubu ile hipoksi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p>0.005). Hipoksi grubu ile deney grubu karşılaştırıldığında; VEGFR-1 değerleri açısından gruplar arasında fark yok iken EPO1 grubunun VEGFR-2 ve VEGFR-3 değerleri hipoksi grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti (p<0.05, Şekil).



Sonuç: Bulgular hem embriyo ve beyin gelişiminde hem de anjiogenezisde, daha ziyade lenfanjiogenezisde görev yaptığı düşünülen VEGFR-3 dahil olmak üzere her üç VEGF reseptörünün de rol oynadığını göstermiştir. İlaveten VEGF'in anjiogenezisde olduğu kadar nörogenezisde de etkili olduğunu ve EPO ile karşılıklı etkileşim göstererek vücudun hipoksiye karşı endojen bir savunma sistemi olarak görev yaptığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Embriyo kültürü, Eritropoietin, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

THE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN TREATMENT ON EMBRYO DEVELOPMENT AND VEGF RECEPTOR EXPRESSION IN HYPOXIC EMBRYO CULTURES

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to evaluate the alteration with erythropoietin (EPO) of adverse effect of hypoxia on neurogenesis and angiogenesis in rat embryo cultures and correlation of EPO and vascular endothelial growth factor (VEGF).

Materials and method: Our study was performed on four experimental groups and one control group. WRS (Whole rat serum) was used in control group. WRS's embryo was made hypoxic in hypoxia group (1. and 2. day 5%, 3. day 40% oxygen gassing system). Recombinant human erythropoietin (rHUEPO) was added 200U/ml in EPO1 group, 100 U/ml in EPO2 group, 50 U/ml in EPO3 group. Control group was not hypoxic and did not add EPO. Embryos that is 11,5 day were evaluated under the light microscope as a morphological scores system. VEGFR-1, VEGFR-2, and VEGFR-3 expressions were investigated with Real-Time PCR in rat embryo brain tissue.

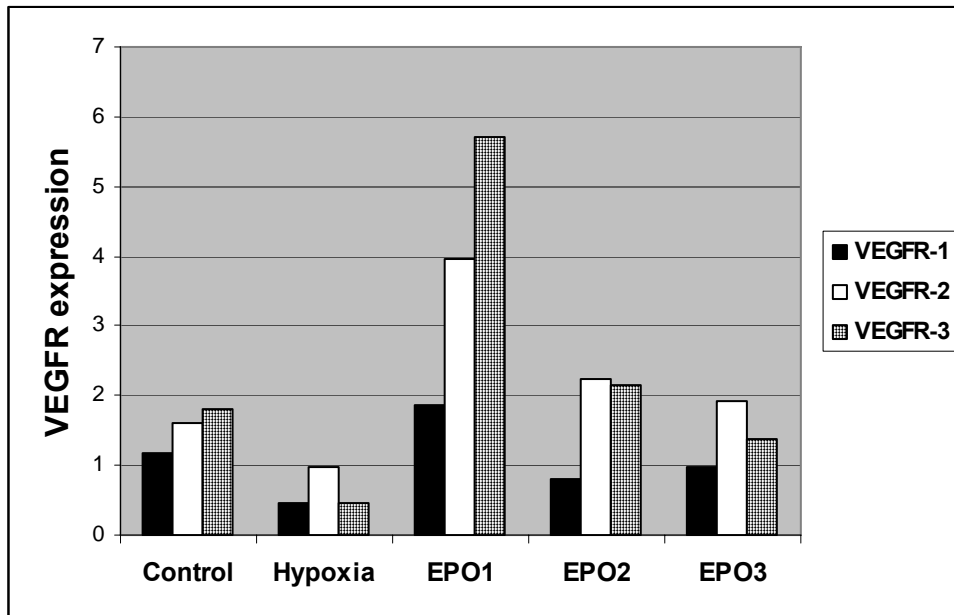
Results: Morphologic scoring system done using total morphologic score, yolk sac diameter, crown-rump length and somite number revealed retardation in all experimental groups when compared to control. This developmental retardations were statistically significant ($p < 0.05$, Table)

Variable	Control (n:10)	Hypoxia (n:10)	Hypoxia+EPO groups			P value
			EPO1 (n:10)	EPO2 (n:10)	EPO3 (n:9)	
Total morphologic score	55.30±7.22	23.0±4.61 a	36.20±5.07 a,b	19.70±5.07 a,c	28.10±13.5 a	<0.05
Somit number	22.10±3.78	10.30±3.59 a	15.29±2.30 a,b	8.10±2.55 a,c	11.56±5.70 a	<0.05
Yolk sac diameter	5.70±0.38	5.08±0.66	4.36±1.20	5.02±0.85	4.70±0.54 a	<0.05
Crown-rump length	4.84±0.63	2.78±0.58 a	2.69±0.41 a	2.48±0.33 a	2.91±0.46 a	<0.05

a p<0.005; compared with control group
b p<0.005; compared with hypoxia group

c p<0.005; compared with EPO1 group

VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 expressions did not display any significant differences between control and hypoxia group ($p>0.005$). Compared hypoxia and control group, there was not significant differences between groups but VEGFR-2 and VEGFR-3 expressions were significantly higher in EPO1 group than hypoxic group ($p<0.05$, figure).



Conclusion: Our findings showed that each of the VEGF receptors, including VEGFR-3 thought to function predominantly lymphangiogenesis, play a role in both embryo-brain development and angiogenesis. In addition, VEGF is effective in neurogenesis as in angiogenesis, and functions as an endogenous defense system against hypoxia interacting with EPO.

Key words: Embryo cultures, Erythropoietin, Vascular Endothelial Growth Factor

GİRİŞ ve AMAÇ

Sıçanlarda organogenez dönemi 9,5-11,5 günler arasındır. Bu dönemde yapılan embriyo kültürü teratojenik etkenlerin tespiti dışında anjiogenez ve nörogenez mekanizmalarını öğrenme açısından önem arz etmektedir. Organogenez süresince hipoksiye çok kısa dönemde bile maruz kalmanın embriyonun büyüme ve gelişmesini bozabileceğini, hipoksinin hem büyüme hem de farklılaşma üzerinde etkisi olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Günümüze kadar embriyo kültüründe hipoksi oluşturulan çok az çalışma bulunmaktadır.

Eritropoietin (EPO) öncelikle eritroid progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayarak eritroid hücre üretimini uyarır. EPO ve reseptörü (EPO-R) gelişmekte olan embriyo ve fetüste yaygın olarak bulunmaktadır. EPO'nun gelişimin erken dönemlerinde genel bir morfogenez ve nörogenez uyarıcısı olduğu düşünülmektedir. EPO-R'nün embriyogenezde yokluğu nöral progenitör hücre sayısında ve nöron gelişiminde azalma ve nöronal apoptozda artma sağlamaktadır.

EPO ve EPO-R olmayan farelerin eritropoiez olmadığından 13,5 gün civarında öldüğü fakat eritropoiez etkilenmeden önce nöroepitelin incelendiği, apoptozun arttığı ve beyin büyüklüğünün azaldığı görülmüştür. Ayrıca bu farelerde 10,5 günlük iken olması gereken nöral tüp kapanması gerçekleşemez. Bu durum EPO ve EPO-R'ün erken beyin gelişimindeki önemini göstermektedir.

EPO ve EPO-R insan fetüsünde yaklaşık 5. hafta civarında santral sinir sisteminde ekspre edilir ve 8-24 haftalarda gittikçe artar. Fetal karaciğer ve erişkin böbreğinde EPO üretimine ek olarak beyinde astrosit ve nöronlarda da EPO üretilir. Hipoksiye cevap olarak beyinde endojen EPO artışı EPO'nun beyinde korumayı sağlamak için parakrin ve otokrin rolü olduğunu göstermektedir. *In vitro* olarak hipoksi, *in vivo* ise

anemi EPO ve EPO-R ekspresyonunu uyarmakta ve hassasiyetlerini arttırmaktadır. Hipoksidede endojen EPO artışı hipoksi ve iskemi tedavisinde EPO kullanımını gündeme getirmiştir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) anjiogenez, damar geçirgenliğinde artışı ve glial hücre çoğalmasında rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla nöron korunmasında ve nörogenezde de katkısı olduğu açığa çıkarılmıştır.

Sıçan hipokampal nöron kültüründe hipoksi ile indüklenen faktör-1 α (HIF-1 α) aracılığı ile nöronlarda, mikroglial hücrelerde, makrofajlar ve endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır. VEGF iskemi sonrası anjiogenezi sağladığı için beyin dokusunu iskemiye karşı korumaktadır. Hipoksi sonrası EPO'nun ana hedefi nöronlar; VEGF'in ise endotel hücreleridir. EPO ve VEGF'in karşılıklı etkileşimleri ve glial hücreler üzerindeki etkileri tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

EPO'nun VEGF/ VEGF reseptör sistemi aktivasyonu aracılığı ile endotel hücrelerini dolaylı olarak etkilediği *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. EPO güçlü bir anjiogenik faktör olan VEGF ile sinerjistik etki gösterir ve ikisinin de etki göstermesinde hipoksi önemli rol oynar.

Bu çalışmanın amacı, anjiogenez ve nörogenezin anlaşılmasına olanak sağlayan *in vitro* embriyo kültüründe hipoksi sonrası verilen EPO'nun hem embriyo gelişimine hem de beyin VEGF reseptör ekspresyonları üzerine etkisini araştırarak EPO ve VEGF etkileşimini ortaya çıkarmaktır.

GENEL BİLGİLER

***İN VİTRO* SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ**

Embriyo kültür tekniği 30 yıldan beri toksikolojik tarama, embriyoloji ve teratoloji alanındaki temel biyolojik mekanizmaların tespiti için kullanılmaktadır. Erken embriyogenezis döneminde (9-11 gün arası) postimplantasyon embriyo kültürü standart bir metot haline gelmiştir (1-8). Memeli embriyoları arasında özellikle sıçan ve fare embriyosu diğer türlerden daha fazla tercih edilmektedir. Embriyo kültür çalışmalarında yaygın olarak ksenobiyotikler (9,10), ilaçlar (11-15), kimyasal ajanlar (16,17) ve normal embriyonik büyüme ve gelişme üzerine etkili mekanizmalar araştırılmıştır.

New ve arkadaşları memeli embriyo kültürünü başlangıçtan organogenezisin bittiği kritik gelişim dönemine kadar başarılı bir şekilde gerçekleştirmişlerdir (1). Total protein içeriğinin tespiti ile gösterilmiştir ki kültürdeki büyüme *in vivo* büyüme ile benzerdir. Fonksiyonel plasenta olmaması nedeniyle ekstremiteler oluşumundan sonraki büyüme daha azdır. Bununla birlikte başarılı bir embriyo kültürü ile kardiyak çıkıntının oluşması, miyofibrilogenenezis ve beyin oluşumu gibi önemli gelişimsel basamaklar başarı ile gösterilmektedir (3).

***In Vitro* Kültür Sistemlerinin Önemi**

Teratojenlerin ve ilaçların etkilerinin önceden belirlenebilmesi ve doğumsal malformasyonların etkilerinin daha erken saptanabilmesi için hayvan deneyleri önem kazanmıştır. Bu amaçla da *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar başlatılmıştır (2,5,8). Embriyo kültür metodu teratojenik etkileri, organogenezis dönemindeki anjiogenezis ve nörogenezisi gösterme bakımından mükemmel bir tekniktir.

Sıçanlarda embriyonik gelişimin 9,5.-11,5. günleri arası organ taslaklarının geliştiği dönemi (organogenezis dönemi) kapsamaktadır. Sıçan embriyo kültüründe nörogenezis, gliogenezis ve nöronal migrasyon değerlendirilmesi için en uygun 11. gün, ekstremit gelişiminin değerlendirilmesi için 14-15. gündür. Bu dönem insanlar için gelişimin 15.-60. günleri arasına denk gelmektedir. Bu dönemde teratojenlere maruz kalmak malformasyonlara sebep olabilirken daha erken dönemlerde maruz kalmak ise gebeliğin sonlanmasına neden olur. *İn vivo* test ile karşılaştırıldığında canlı hayvanlar üzerinde çalışılmadığı, daha ucuz ve hızlı olduğu için daha üstün özelliklere sahiptir (5). Embriyo kültür metodunda malformasyon ve embriyo toksisitesi oluşturması bakımından maddelerin direkt serum konsantrasyonları test edilebilir ve insandaki serum konsantrasyonlarına uygun hale getirilebilir. Dezavantaj olarak bakıldığında ise *in vitro* test embriyogenezisin sınırlı bir dönemini içerdiği için kısıtlı bir zaman dilimini göstermektedir. *İn vitro* testler içinde yanlış negatiflik problem olarak gözükmektedir. Bu durum talidomit faciası ile ortaya çıkmıştır. Talidomit tavşan ve insanlar için teratojenik olan fakat sıçan ve farelerin için teratojenik olmayan indeks bir kimyasal olarak önemini korumaktadır (9-15).

Embriyolarda *İn Vitro* Büyüme ve Gelişiminin Değerlendirilmesi

Embriyonun büyüme ve gelişmesini kantitatif olarak hesaplamada tanımlayıcı parametreler kullanılmaktadır. Van Maele-Fabry ve ark. (1990)'nın morfolojik skorlama sistemi Brown ve Fabro (1981)'nin skorlama sisteminin modifikasyonu şeklindedir (18). Bu değerlendirmede genel olarak büyüme değerlendirmesi için, başkık uzunluğu; farklılaşma için somit sayısı; gelişme için embriyo fleksiyonu başta olmak üzere ön/orta/arka beyin, kaudal nöral tüp, optik ve olfaktör sistem, maksiler ve mandibuler çıkıntı, brankiyal ark ve ön ile arka ekstremiteler değerlendirilir (18). Bu sistem kullanılarak sıçan gebeliğinin 10, 11, 12 ve 13. günlerinde çıkartılan embriyolarda 17 morfolojik özelliğe bakılmaktadır. Gelişim safhalarına 0 ile 5 arasında değişen puanlar verilmiştir. Bu parametreler şunlardır:

Vitellus kesesi damarlanması; damar oluşmaz veya kan adacıkları oluşursa 0 puan, ektoplasental kon etrafında kan adacıkları oluşursa 1 puan, vitellus kesesi üzerinde birkaç ince damar oluşursa 2 puan, vitellus kesesinde damar ağı oluşursa 3 puan, ana damardan çok sayıda ince dallar çıkıyorsa 4 puan, vitellus kesesi sapı oblitere olup vitellin arter ve ven ayrılıyorsa 5 puan verilir.

Allantois; eksosölomda allantois serbest olarak görülürse 0 puan, allantois koryon ile kaynaşmış ise 1 puan, umblikal dolaşım oluşursa 2 puan, umblikal ve vitellin damarlar aorttan ayrıldığı görülürse 3 puan verilir.

Fleksiyon; ventral olarak konveks ise 0 puan, $\frac{1}{4}$ oranında rotasyon varsa 1 puan, $\frac{1}{2}$ 'lik bir rotasyon varsa 2 puan $\frac{3}{4}$ 'lük rotasyon varsa 3 puan, dorsal olarak konveks ise 4 puan, tamamen katlanırsa 5 puan verilir.

Kalp; endokardial yapı görünürse 0 puan, kalp görünüyorsa 1 puan, kalp S harfine benzer tüp şeklinde ise 2, atrium ve ventrikül arasında bir bölme oluşmuş ise 3, kalp üç bölmeye ayrılmış ise 4 ve kalp dört bölmeye ayrılmış ise 5 puan verilir.

Kaudal nöral tüp; nöral tabaka veya nöral katlantı oluşmuş ise 0 puan, nöral tabaka kapanmış ancak nöral katlantı ile birleşmiş ise 1 puan, nöral katlantı 4-5 somit seviyesinde birleşmiş ise 2 puan, arka nöropor şekillenir ancak açık ise 3 puan, arka nöroporda küçük bir açıklık var ise 4 puan, arka nöropor kapalı ise 5 puan verilir.

Arka beyin; nöral tabaka oluşmuş ise 0 puan, V-şeklinde nöral katlantı varsa 1 puan, nöral katlantı U-şeklinde ise 2 puan, ön nöropor oluşmuş ancak açık ise 3 puan, ön nöropor kapalı, rombensefalon şekillenmiş ise 4 puan, dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons birleşmiş ise 5 puan verilir.

Orta beyin; nöral tabaka veya mezensefalik beyin katlantısı varsa 0 puan, V-şeklinde nöral katlantı varsa 1 puan, U-şeklinde nöral katlantı varsa 2 puan, kısmen mezensefalik katlantı birleşmiş ise 3 puan, tamamıyla mezensefalon birleşmiş ise 4 puan, mezensefalon ve rinensefalon arasında bir bölme varsa 5 puan verilir.

Ön beyin; nöral tabaka oluşmuş ise 0 puan, V-şeklinde nöral katlantı varsa 1 puan, U-şeklinde nöral katlantı varsa 2 puan, prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş ise 3 puan, prosensefalon tamamen birleşmiş ise 4 puan, telensefalik evaginasyon görünürse 5 puan verilir.

Otik sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, düz bir otik primordium varsa 1 puan, otik çukur varsa 2 puan, otik vezikül kapalı ancak epidermisten ayrılmamış ise 3 puan, otik vezikül epidermisten ayrılmış ise 4 puan, otosit dorsale yerleşmiş ise 5 puan verilir.

Optik sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, sulkus optikus varsa 1 puan, optik primordium uzamış ise 2 puan, optik primordium oval şekilli ise 3 puan, primer optik

vezikül oluşmuş ve optik sap açık ise 4 puan, lens tabakası oluşmaya başlamış ise 5 puan verilir.

Olfaktör sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, olfaktör tabaka varsa 1 puan, olfaktör tabaka çevrelenmiş ise 2 puan, olfaktör çıkıntı belirgin ise 3 puan verilir.

Brankiyal ark; brankiyal bar görünmüyorsa 0 puan, bir tane brankiyal bar varsa 1 puan, iki tane brankiyal bar varsa 2 puan, üç tane brankiyal bar varsa 3 puan verilir.

Maksiller çıkıntı; rudimental bar kafanın ön kısmıyla birleşmiş olarak görünüyorsa 0 puan, rudimental bar kafanın ön tarafından ayrılmış ise 1 puan, brankiyal bar ile maksiller çıkıntı arasında içeriye doğru bir çıkıntı olursa 2 puan, mandibular çıkıntı ile ön beyin arasında bir tabaka oluşursa 3 puan verilir.

Mandibular çıkıntı; herhangi bir şey görünmüyorsa 0 puan, mandibular çıkıntı ventral kenar boyunca ayrılmış ise 1 puan ventral kenarlar birbirine temas ediyorsa 2 puan, bu kenarlar birleşmiş ise 3 puan verilir.

Ön ayak; herhangi bir şey oluşmamış ise 0 puan, 9 ila 13 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa 1 puan, ön ayak tomurcuklanmış ise 2 puan, ön ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise 3 puan verilir.

Arka ayak; herhangi bir şey oluşmamış ise 0 puan, 26 ila 30 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa 1 puan, arka ayak tomurcuklanmış ise 2 puan, arka ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise 3 puan verilir.

Somitler; somit sayısı 0 ila 5 arasında ise 0 puan, 6 ila 10 arasında ise 1 puan, 11 ila 15 arasında ise 2 puan, 16 ila 20 arasında ise 3 puan, 21 ila 25 arasında ise 4 puan, 26 ila 30 arasında ise 5 puan verilir.

Her bir embriyo için skorların toplam sayısal değeri morfolojik skor olarak değerlendirilir. Embriyo kültür deneylerinde morfolojik skora sistemin kullanımı embriyonik gelişimin ayrıntılı indeksini vermektedir (3,4,18).

EMBRİYONİK GELİŞİM

Erken Dönem Embriyonik Sıçan Gelişimi

Sıçanlardaki gebelik süresi 21-22 gün sürerken insanlarda bu süre 267 gündür. Cleavage (yarıklanma) ve blastula safhaları benzerlik gösterirken blastosist safhasından sonra sıçan embriyo gelişimi bazı yerlerde farklılık gösterir (6,8).

Sıçan embriyosu 4,5 günlükken anne rahmine yerleşir ve embriyonik silindir (egg cylinder) oluşturmak için gelişmeye başlar. Embriyonik silindir 5,5 günlük iken embriyonik ve ekstraembriyonik kısımdan oluşur. Embriyonik kısım olan epiblast fetus oluşumunu, visseral endoderm ve embriyo dışı ektoderm ise plasenta gibi extraembriyonik yapıların oluşumunu sağlar (6).

Embriyo 10,5 günlükken fark edilebilir yapıdadır. Nöral krest, kas-iskelet sistemi, kalp, ön barsak ve karaciğer tomurcukları ile somitler (7-9 arasında) belirginleşmiştir. Buna ek olarak allantois eksosölom karşısında gelişir ve ekto-plasental kon ile birleşir. Bu zamanda, embriyo ventral olarak konveks olup hemen katlanmaya başlar ve kuyruğu kıvrılır. Bükülme 10. günde embriyonun amniyotik kavite tarafından çevrenmesiyle başlar ve embriyo 11,5 günlükken tamamlanır. Embriyo amniyon kesesi içinde katlandığı için amniyon embriyonun etrafını çevreler ve aynı zamanda etrafında vitellus kesesi gelişir böylece hem amniyon hem de embriyo tamamen vitellus kesesi içinde yer alır. Sıçan embriyosu 12,5 günlükken bütün organlar belirgindir ve bu durum insanlarla karşılaştırıldığı zaman 8. haftaya denk gelir. Aynı zamanda embriyo, korio-allontoik plasenta ve damarlanmış vitellus kesesi plasentası olmak üzere iki plasentaya sahiptir. Allantoik plasenta gebeliğin son safhasında önemli olmasına rağmen, vitellus kesesi embriyonik gelişim periyodu sırasında esas besleyici organdır (3-5,8).

Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi

Metabolik ihtiyaçların karşılanabilmesi için ilk olarak dolaşım sistemi gelişmeye başlar (6). Embriyonik gelişimin erken döneminde pek çok organ damarsız olarak gelişmeye başlar. Bu organların damarlanmasının damar kanallarının ve kılcıl damar ağının şekillenmesiyle aynı zamanda olduğu belirlenmiştir.

Embriyo içindeki kan damarları vaskulogenez ve anjiogenez ile şekillenir. Farklılaşan anjioblastlar mezoderm içinde ilk kılcıl ağı oluşturur ve daha sonra büyük damarlar (dorsal aorta ve aortik arklar) kaynaşarak yeni büyük damarları oluştururlar. Endodermal organların damarlanması (örneğin akciğer, pankreas, mide ve bağırsak gibi) endotel hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur (3,4,6). Bu durum hem organ damarlanmasının mekanizması hem de endotel hücre farklılaşması için çok önemli bir bulgudur. Diğer taraftan, bazı organların damarlanması açık bir şekilde anjiogeneze bağlıdır. Beyin ve böbrek gibi organların damarlanması organogenezin erken döneminde buraya göç eden endotel hücreleri tarafından oluşturulur.

Sıçanlarda, mezodermal germ tabakası şekillendiği zaman (yaklaşık olarak gebeliğin 9,5. gününde) kan damarlarının ilk gelişimi de başlar. Kan damarları şekillendikten sonra bu damarların birleşmesi sonucunda ilk damar ağı oluşur (3). Rudimenter halde olan kalp embriyo 6 somite ulaştığında hızlı bir şekilde gelişmeye başlar. Kalp bundan sonra kan dolaşımını devam ettirebilme yeteneğindedir (3). Gebeliğin 11-12. gününde plasental dolaşımın oluşmasıyla besleyici molekülleri vitellus kesesinden embriyoya damarlar aracılığıyla taşınır. Son yıllarda çeşitli büyüme faktörlerinin angiogenezi doğrudan ya da dolaylı olarak indüklediği belirtilmiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip büyüme faktörlerinden bazıları şunlardır: epidermal büyüme faktörü (EGF), asidik fibroblast büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), tümör nekrozis faktör- β (TNF- β), angiogenin, angiotropin, vasküler endotel hücre büyüme faktörüdür (VEGF).

ERİTROPOİETİN

Eritropoietin (EPO), izole edilen ilk insan hematopoietik büyüme faktörüdür. Molekül ağırlığı 30,4 kDa olan bir glikoprotein olup 165 aminoasitten oluşmaktadır. Erişkinlerde %90'ı böbrekte, %10'u karaciğerde üretilir. İnsan EPO geni, beş ekson ve 4 intron içerir ve kromozom 7'nin uzun kolunda lokalizedir. Böbreğin peritübüler fibroblastları ve karaciğer hepatositleri primer EPO üretim yeridir (19-20).

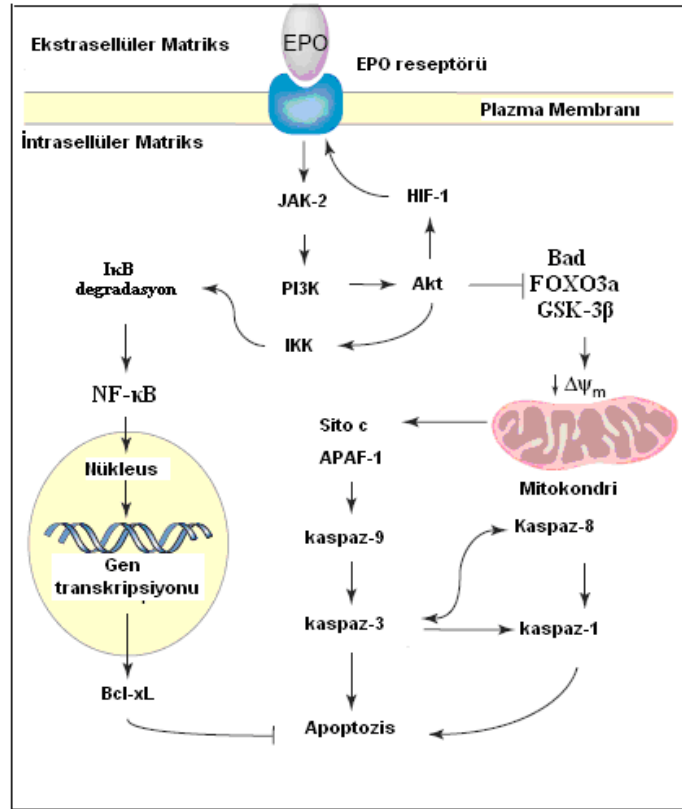
Moleküler biyolojik çalışmalar; EPO'nun sitokin süper ailesinin bir üyesi olduğunu gösterdiğinden beri büyüme, hücre koruma ve inflamasyondaki rolüne daha fazla dikkat edilmektedir. EPO ve reseptörleri; santral sinir sistemi (SSS), barsak, böbrek, kas (düz-iskelet ve kalp), uterus, retina, pankreas, gonadlar ve akciğerde bulunmaktadır (19). EPO'nun metabolik stres altındaki dokuların korunmasını yöneten parakrin/otokrin sistemde rol oynadığını düşünülmektedir.

Eritropoietinin Etki Mekanizması

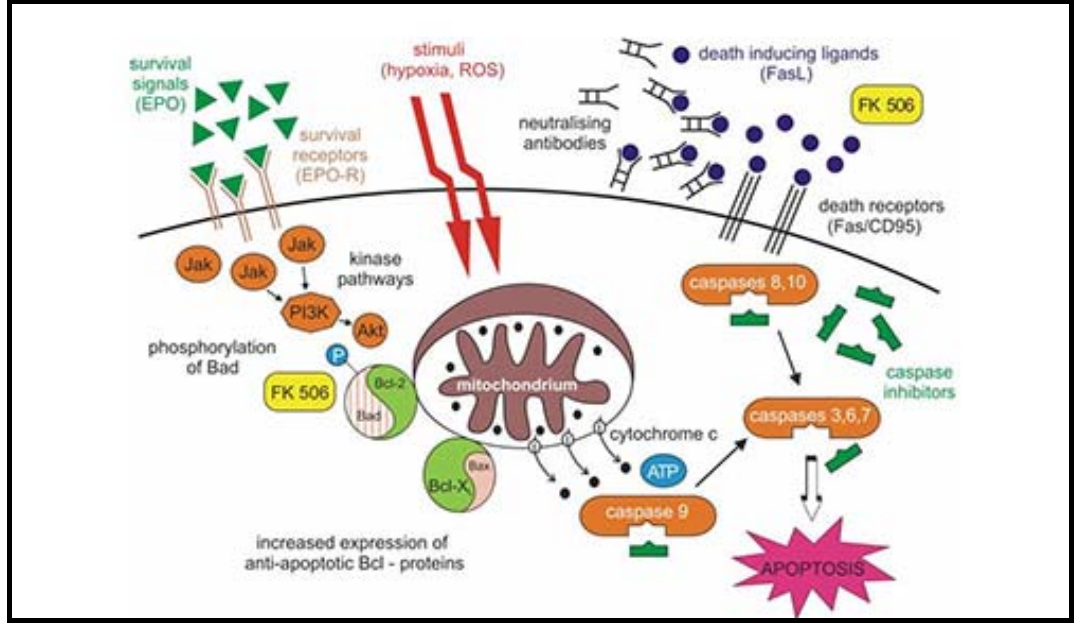
Temel işlevini gerçekleştirmek için EPO hücrelerdeki bir yüzey reseptörüne (EPO-R) bağlanır ve reseptöre EPO nun bağlanması ile reseptör homodimerize olarak aktifleşir. EPO-R hematopoietik, endotelial, iskelet, kas ve nöral doku progenitör hücrelerinde eksprese edilir (20-23). EPO reseptörü ile bağlanınca Janus tirozin kinaz -2 (JAK-2) otoposforile olur. JAK-2, protein kinaz B (Akt) ve diğer alt basamaklarını aktive etmektedir. Bu alt basamaklar, FOXO3a, GSK-3 β (glikojen sentetaz kinaz), Bad, STAT5, PI3K (Fosfoinozitol 3-fosfat), Bcl-xL, NF- κ B (Nükleer faktör κ B),

APAF-1 (Apopitotik proteazı aktive eden faktör-1), mitokondrial membran geçirgenliği ve kaspazlardır (Şekil 1). EPO reseptörü aracılığıyla, apopitozu sağlayan bad, bcl, kaspazlar gibi moleküllerin aktivitesini azaltarak ve Bcl-2, NF-κB gibi antiapopitotik moleküllerin aktivitesini arttırarak apopitozu önlemeye çalışır (22)(Şekil 2).

Sonuçta hedef dokudaki EPO-R uyarımının net etkisi; çoğalma, apopitozun inhibisyonu ve hücrelerin farklılaşmasıdır (22-24).



Şekil 1. EPO'nun reseptörüne bağlanması ile gelişen olaylar zinciri



Şekil 2. EPO ve EPO reseptörünün apoptozis üzerine etkileri

Nöronlara ek olarak EPO-R astrositler ve mikroglialarda da ekspre olur. Eritroid hücrelerde EPO-R ekspresyonu ile aktive olan GATA-1 uyarılır. Nöral NT2 hücrelerinde GATA-3 ile EPO-R promotor bölgesi aktive olur. EPO eritroid progenitör hücrelerde GATA-1'i, nöral hücrelerde GATA-3'ü indükler. İnsanlarda eritropoiezis yeri olan kemik iliğinde EPO-R ekspresyonu erişkin beyninde çok fazla olmasına rağmen nöronlarda EPO-R fonksiyoneldir.

Hüresel seviyede EPO'nun nöronlarda kalsiyum akışının regülasyonunda rol aldığı tesbit edilmiştir. İnsan nöroblastom hücre serilerine dışardan uygulanan EPO, plazma membran T-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanalları yolu ile kalsiyumun hücre içine akışına sebep olmuştur. Ayrıca feokrositoma hücre serisinde, kalsiyumun geri emilimini arttırdığı gösterilmiştir (22,27). Böylece hücre içi monoaminlerin konsantrasyonlarını, tirozin hidrosilaz aktivitesini ve dopamin salınımını da arttırmaktadır. Sıçanların strial kesitlerinde, potasyumun indüklediği asetilkolin salınımını da uyardığı gösterilmiştir. Yine sıçanların hipokampal kesitlerinde oluşturulan oksijen ve glikoz yoksunluğu sırasında EPO'nun sinaptik transmisyonunun arttığı gösterilmiştir .

EPO'nun glutamat reseptör agonistleri tarafından oluşturulan eksitotoksik nöronal ölümü engellediği de çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Nöronlara EPO verilmesiyle birlikte kainik asit tarafından oluşturulan toksisitenin engellendiği gösterilmiştir. Üstelik EPO, *in vitro* iskemi oluşturulan serebellar nöronlar üzerinde, kalsiyumun

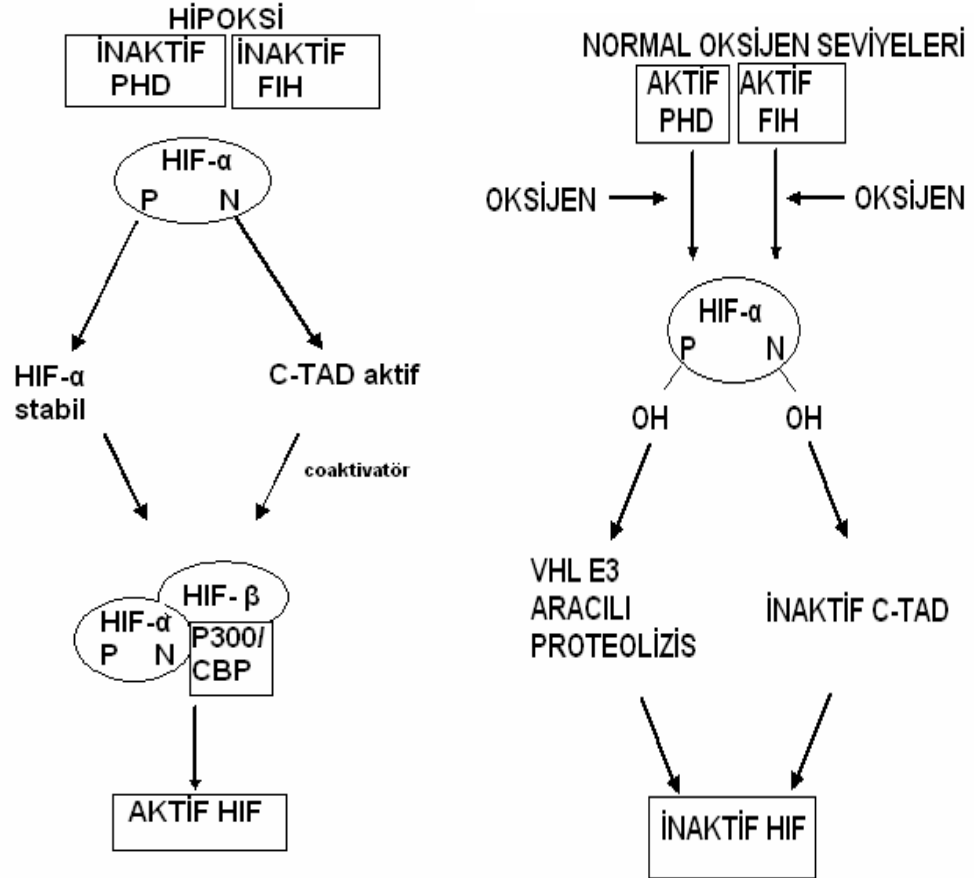
neden olduğu glutamat salınımını bloke etmektedir. Böylece EPO, ilgili reseptörlerdeki glutamat aktivitesini engelleyerek iskemik hücre ölümünü baskılayabilmektedir. Ayrıca glutamatın nöronlar üzerindeki aşırı etkisi sonucu, belirgin NO üretimi meydana gelmekte, NO'da süperoksitlerle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmakta, sonuçta da hücrelerde hasar artmaktadır. Yapılan çalışmalarda EPO'nun NO seviyelerini direkt etkileyememesine karşın oluşturduğu hasarı azalttığı öne sürülmektedir (19,24).

EPO Salınımının Oksijen-Bağımlı Düzenlenmesi

Memelilerde normal doku işlevleri, yeterli oksijen teminine dayanmaktadır. Oksijen temini ve tüketimi arasındaki bir değişiklik hücresele, lokal ve sistemik seviyede çeşitli özel adaptasyon mekanizmalarını harekete geçirir. Bu mekanizmalar kısmen hipoksinin tetiklediği transkripsiyon faktörleri olan Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) ve Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2)'nin aktivasyonu ile yönetilmektedir. HIF-1 ve HIF-2 sırasıyla VEGF ve EPO gibi hipoksi ile kodlanan genlerin ekspresyonunu sağlamaktadır (25).

Vücuttaki hipoksik adaptasyon işlemlerinin çoğu HIF-1 ve HIF-2 tarafından yapılan transkripsiyonel regülasyona dayanmaktadır. HIF-1'in hedefleri eritropoezde olduğu kadar anjiogenez, vazomotor kontrol, enerji metabolizması ve apoptozda yer alan genlerden oluşmaktadır. Beyinde, HIF-1'in α alt birimi hipoksi sırasında güçlü bir şekilde uyarılır, ve uzun süren HIF-1 düzeyleri yüksekliği, bu organda hipoksi sırasında görülen sürekli EPO artışından sorumludur. Oksijen bağımlı EPO ekspresyonu daha çok HIF-1 tarafından kontrol edilmektedir. HIF-1 fizyolojik olarak uygun oksijen seviyelerinde aktive olur ve hipoksik strese hızlı ve yeterli cevabı sağlar. Aktivasyon sonrası HIF-1, EPO ve VEGF gibi oksijen tarafından düzenlenen genler ile ilişkili hipoksiye cevap verebilen özel DNA bölgelerine bağlanır. Normal oksijen seviyelerinde HIF-1 α üzerindeki prolin bölgesi prolin hidroksilaz (PHD) ile hidroksilasyona uğramaktadır. Bu prolin hidroksilasyonu, HIF- α alt biriminin proteolizine yol açan von Hippel Lindau proteininin bağlanmasına imkân tanır. Diğer taraftan HIF inhibe eden faktör (FIH) ile HIF- α üzerindeki asparajinil bölgesi hidroksilasyona uğramakta ve HIF-1 α üzerindeki C-terminal transaktivasyon bölgesinde inaktive olmaktadır. Bu reaksiyonlarda hidroksilazların normal oksijen seviyelerindeyken aktif, fakat hipoksidedeyken inaktif olduğu görülmektedir. Sonuçta

HIF inhibe olmakta ve EPO geninin ekspresyonu oluşmamaktadır. Hipoksizde ise PHD ile FIH inhibe olmakta ve bu hidroksilazların inhibe olmasıyla aktif ve kararlı HIF- α meydana gelmektedir. Kararlı HIF- α , HIF- β ile beraber bir DNA bağlayan heterodimer oluşturma yeteneğine sahiptir. Oluşan heterodimer, transaktivasyon yerinde koaktivatörler ile transkripsiyonel aktiviteyi sağlar. Bu şekilde hipoksizde HIF aktivasyonu oluşarak EPO gen ekspresyonu meydana gelmektedir (26-32) (Şekil 3).



VHL E3: Von Hippel-Lindau E3
PHD: Prolil Hidroksilaz Domain
Domain

FIH: HIF- α inhibe eden faktör

HIF- α : Hipoksinin İndüklediği Factor

P: Prolin, N: Asparajin

C-TAD: C-Terminal Transaktivasyon

HIF- β : Hipoksinin İndüklediği faktör- β

CBP: CREB Bağlayan Protein

Şekil 3. Hipoksizde ve normal oksijen seviyelerinde HIF regülasyonu

Oksijen taşıma kapasitesi veya oksijen saturasyonunda azalma, doku hipoksisine neden olmakta ve EPO gen ekspresyonunda artış meydana gelmektedir. Kandaki

EPO konsantrasyonunun artması, kemik iliğindeki eritropoezi uyarır ve sonunda oksijen temininde artış meydana gelir. Oksijen düzeyindeki artışın sonucunda, negatif bir etki ile aktif olan EPO geninin aktivasyonu azalmaktadır.

EPO reseptör gen transkripsiyonu *in vivo* olarak sistemik hipoksi ile doğrudan etkilenmez, fakat *in vitro* kültürde hipokampal nöronlar hipoksiye maruz kalınca EPO reseptör gen mRNA'sının sayısında artış gösterilmiştir. Ayrıca, anemi ve iskemik koşulların her ikisi de *in vivo* EPO'ya nöronal hücrelerin hassasiyetini ve EPO reseptör salınımını arttırmıştır (29-32).

Beyinde EPO üretimine endotel hücreleri de katkıda bulunur. Fare nöronları ve astrositlerinde bazal EPO ekspresyonu yanında inme sonrası endotel hücrelerinde EPO ekspresyonu görülür. Orta düzeyde iskemi veya hipoksiye önceden maruz kalmak beyin iskemisine toleransı sağlar. Örneğin fokal beyin iskemiden 24 sa önce subletal düşük oksijen seviyesine maruz kalan farelerde infarkt volümünün azaldığı tespit edilmiştir. Bu tolerans durumu HIF-1 α ve HIF aracılığıyla etki gösteren EPO ve VEGF ekspresyonu ile ilişkilidir.

Hipoksinin şiddetine bağlı olarak böbrekte 200 kata kadar olan indüksiyona karşı, EPO mRNA seviyelerinin beyinde 3 ile 20 katlık bir artış gösterdiği gözlenmektedir. Sonuçta beyindeki hipoksik EPO gen aktivasyonunun indüksiyon seviyeleri daha düşük olsa da, böbreklerdeki ile çok benzer bir şekilde EPO uyarımı meydana gelmektedir. Hücresel seviyede *in vitro* çalışmalarda, EPO ekspresyonunun hipoksiye cevap olarak 100 kat arttığı belirlenmiştir. Ayrıca stres koşullarında nöronal hücrelerin EPO duyarlılıklarının arttığı da gözlenmiştir (25).

ERİTROPOİETİNİN SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDEKİ ROLÜ

Beyinde EPO ve EPO Reseptör Salınımı

İnsan beynindeki EPO gen salınımı temporal korteks, hipokampus ve amigdalada bulunmuştur. Ayrıca, EPO yetişkinlerde ve yeni doğanlarda beyin omurilik sıvısında (BOS) saptanmıştır. Hücresel düzeydeki *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda beyindeki astrosit ve nöronların EPO kaynağı olduğu gösterilmiştir.

EPO reseptör mRNA ve proteininin salınımı, fındık faresi, sıçan, maymun ve insanlarda gösterilmiştir. Özellikle, beyinde kapillerler etrafındaki astrositlerin güçlü bir şekilde reseptör salınımı yaptığı gözükmektedir (24,25,33,34). Buna ek olarak,

EPO reseptör immunoreaktivitesi endotel hücreleri, insan mikroglial hücre kültürlerinde ve sıçan oligodendrositlerinde gösterilmiştir (29,30).

Nöronlar, endotel hücreleri, mikroglial hücreler ve astrositlerin dâhil olduğu beyin hücre tiplerinde EPO-R yaygın olarak bulunur (Tablo I).

Tablo I. Santral sinir sisteminde EPO ve EPO reseptör salınım bölgeleri

	EPO				EPO Reseptörü			
	Kemirgenler		İnsanlar		Kemirgenler		İnsanlar	
Hücre tipleri	İn vitro	İn vivo	İn vitro	İn vivo	İn vitro	in vivo	İn vitro	İn vivo
Nöronlar	+	+	-	+	+	+	+	+
Astrositler	+	+	+	+	+	+	+	+
Mikroglial Hücreler	AE	AE	-	AE	AE	AE	-	AE
Oligodendrositler	+	AE	-	AE	+	AE	-	AE
Endotel hücreleri	-	?	AE	?	+	+	+	+

+, salınım tespit edildi; -, salınım yok; AE, analiz edilmedi; ?, ispat edilmedi

EPO ve Kan-Beyin Bariyeri

EPO'nun molekül ağırlığı büyük olduğundan kan beyin bariyerini (KBB) geçmeyi sağlayan lipid aracılığı ile olan transport için büyüktür. Bu yüzden normal koşullarda EPO, KBB'ni geçemez. Travma sonucunda inflamatuvar yanıt oluşur ve KBB'de permeabilite artışı ve hasarlanan alanda nonspesifik transport görülür. Bu durumda EPO spesifik reseptörler aracılığı ile KBB'yi geçer (35,36). İskemi, travma, hipoksi ve inflamasyon gibi durumlarda periferik uygulanan rekombinan insan eritropoietini (r-HuEPO) beyin dokusunda koruyucu etki gösterebilmektedir. Brines ve arkadaşları (35) tarafından sıçanlarda sağ orta serebral arter ve karotid arter oklüzyonuyla oluşturulan fokal iskemik inme modelinde, intravenöz uygulanan EPO'nun KBB'yi geçerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. İnsan beyin otopsilerinde iskemik infarkt veya hipoksik zedelenme sonrası EPO ve EPO-R arttığı gösterilmiştir. Travmatik beyin zedelenmesi olan hastaların BOS'daki EPO konsantrasyonundaki artış serum EPO konsantrasyonu ile değil kan beyin bariyerindeki bozukluğun derecesi ile ilişkilidir. Asfiktik infantlarda kan ve BOS EPO konsantrasyonu yüksek

iken intraventricüler kanama geçiren yenidoğanlarda BOS EPO seviyesi plazma EPO seviyesinden daha yüksektir.

EPO'nun sistemik olarak fazla miktarda uygulanmasında BOS'a geçişi olmaktadır. BOS'a geçen doz uygulanan dozun %1'inden daha azdır (35-37). Sentetik olarak üretilen asialoeritropoietin KBB'yi geçebilir ve santral sinir sisteminde nöron koruyucu etkisi mevcuttur.

Beyin iskemisinde BOS'a geçen EPO kan beyin bariyerinin tamir edilmesinde rol oynamaktadır. Beyin zedelenmesi olmazsa EPO'nun beyine geçişi sınırlıdır. EPO direkt beyin endotel hücrelerinde oksidatif strese karşı hücre zedelenmesini önleyerek koruma sağlamaktadır.

EPO *in vitro* modelde KBB karşı VEGF'in indüklediği permeabiliteyi azaltır. Nöron üzerine direkt koruyucu etkisine ek olarak, kan beyin bariyerini koruması ile de indirekt olarak koruyucu etki gösterir.

EPO'nun Nöron Koruyucu Etkileri ve Fiziopatolojisi

EPO ve EPO-R geliştirmekte olan embriyo ve fetüste yaygın olarak bulunmaktadır. EPO'nun gelişimin erken dönemlerinde genel bir morfogenez ve nörogenezis indükleyicisi olduğu düşünülmektedir. EPO-R'ün embriyogenezde yokluğu nöral progenitör hücre sayısında ve nöron gelişiminde azalma ve nöronal apoptozisde artma sağlamaktadır.

EPO öncelikle eritroid progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayarak eritroid hücre üretimini uyarır. EPO ve EPO-R olmayan fareler eritropoiezis olmadığından 13,5 gün civarında ölürlür. İn utero ölüm öncesi bakıldığında nöroepitelin incelendiği, apoptozisin arttığı ve beyin büyüklüğünün azaldığı görülmüştür (38). Ayrıca bu farelerde 10,5 günlük iken nöral tüp kapanması gerçekleşmez. EPO-R olmayan farelerde embriyoda ciddi anemi görülmeden önce nöronal hücre çoğalmasında yavaşlama ve hipoksiye hassasiyet artmış görülmür. Nöral tüpün tam olarak kapanmaması HIF-1 α ünitesinin ekspresyon eksikliğinde de görülür. EPO-R olmayan fare embriyosunda EPO-R geni verilmesiyle embriyo gelişimi sağlanırken EPO-R eksik erişkin fare beyininde nörogenezisde azalma olduğu görülür. Bu da EPO ve EPO-R'ün erken beyin gelişimindeki önemini göstermektedir.

EPO ve EPO-R midgestasyondan daha erken dönemde de tespit edilmiştir. Gestasyonun ortasında fare beyin gelişiminde EPO-R nöron öncüllerinin çoğalmasını sağlayan nöron epitelinde lokalizedir. Nöral tüpde 10,5 günlük embriyoda EPO-R

ekspresyonunu seviyesi erişkin hematopoietik doku ile karşılaştırılacak düzeydedir. Fareler de 8,5 günlük embriyoda EPO-R nöropitelyumda nöral tüp boyunca eksprese edilir. Beyin ekspresyonu doğumdan sonra azalmaya başlar ve erişkinlerde düşük düzeyde devam eder.

EPO ve EPO-R insan fetüsünde yaklaşık 5. hafta civarında santral sinir sisteminde ekspre edilir ve 8-24 haftalarda gittikçe artar. EPO ve EPO-R ekspresyonunu insan beyninde erişkin olduğu dönemde de devam eder. EPO doğumdan sonra BOS'da da vardır ve hipoksi ile artar.

Fetal karaciğer ve erişkin böbreğinde EPO üretimine ek olarak beyinde astrosit ve nöronlarda da EPO üretilir. Çalışmalarda EPO mRNA'sının fareler, maymunlar ve insan beyin korteksi, temporal lob, hipokampus ve amigdale de eksprese edildiği bulunmuştur. Hücrese seviyede ise, astrositlerin, nöronların EPO'nun kaynağı olduğu *in vivo* ve *in vitro* deneylerde saptanmıştır. PCR ve immünohistokimyasal analizler nöronların ve astrositlerin EPO reseptörü taşıdığını, özellikle de kapillerleri çevreleyen astrositik oluşumlarının reseptörleri güçlü bir şekilde eksprese ettiğini göstermiştir. Son çalışmalarda, reseptörün büyük oranda endotelial hücrelerde, mikroglial hücrelerde, astrositlerin serebral hücre tiplerinde ve periferik sinir kılıflarında bulunduğu belirtilmektedir (33,39).

Beyinde EPO primer olarak glial hücreler tarafından üretilir. EPO'nun düzenlenmesi beyinde böbrekten farklıdır. EPO mRNA ekspresyonu böbrekte hipoksinin başlangıcından sonra 2. saatte pik yapar ve 8. saatte maksimum seviyenin %30'u kadardır. Beyin EPO mRNA hipoksik olaydan sonra 4. saatte pik yapar ve 24 saat yüksek kalır (22-25).

EPO'nun beyindeki fizyolojik etkileri, çeşitli araştırmalarla gösterilmeye çalışılmıştır. İlk çalışmalarda EPO'nun trofik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür. Fare septal nöron kültüründe kolin asetil transferaz aktivitesini arttırdığı ve yetişkin ratlarda septal kolinerjik nöronların rejenerasyonunu desteklediği belirtilmiştir. Son zamanlarda da EPO'nun invitro santral sinir sistemi prekürsör hücrelerinin dopaminerjik farklılaşmasını sağlayarak, canlılığı arttırıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir (40). Hipoksinin indüklediği EPO, ön beyin nöral kök hücreleri üzerine de doğrudan etki etmektedir. Nöronal progenitör hücrelerin üretimine katkıda bulunması EPO'nun hipoksiden sonraki nöronal yapılanmada yer aldığını düşündürmektedir. Bu sonuçlara göre EPO nöronlar üzerinde nörotropik bir faktör olarak etki etmektedir (41-44).

Beyindeki EPO'nun diğeri bir hedefide damar yapıları ve endotelial fonksiyonlardır. Endotelial ve hematopoetik hücreler hemanjioblast olarak adlandırılan aynı mezenşimal prekürsörden köken almaktadır. Bu da endotelial hücrelerin neden EPO reseptörü taşıdığını ve EPO tarafından uyarılabildiğini açıklayabilmektedir. Başlangıç çalışmaları da insan umbilikal ven ve sığırların adrenal kapillerlerinden köken alan endotelial hücreler üzerinde EPO'nun mitojenik ve kemotaktik bir etkisi olduğu gösterilmiştir (45). Son yapılan çalışmalarda ise EPO'nun endotelial progenitör hücre mobilizasyonu için etkin bir fizyolojik uyarıcı olduğu ve doğum sonrası yeni damar oluşumlarını uyardığı gösterilmiştir (46). Yine farelerin uterus kavitesine EPO enjeksiyonu sonrasında endometriumda damar yapıları gözlenmiştir. Beyinde de yapılan benzer çalışmalarda da EPO'nun beyin kapiller endotelial hücreleri üzerinde doz bağımlı mitojenik bir aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Sonuçta yeni damarların gelişimi ile daha fazla eritrosit taşınmasına olanak sağlanabilir ve böylece hipoksik dokuya taşınan oksijen miktarı artabilmektedir. EPO'nun VEGF/ VEGF reseptör sistemi aktivasyonu aracılığı ile endotel hücrelerini dolaylı olarak etkilediği *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (47). Sığırlarda yapılan bir çalışmada EPO'nun tetiklediği aortik ve glomerüler endotelial hücre proliferasyonu, spesifik bir anti VEGF antikoruyla önlediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra aortik hücrelerdeki VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin her ikisi için mRNA ekspresyonu EPO ön tedavisi sonucunda artmıştır. Bir çalışmada da glomerüler endotelial hücrelerin EPO ile inkübasyonu doz bağımlı bir VEGF salınımı ile sonuçlanmıştır. Son yıllarda yapılan bir araştırmada da *in vivo* olarak EPO uygulanmasıyla, endotelial hücrelerin önemli miktarlarda VEGF üretmediği ortaya çıkmış ve çelişkilerden dolayı bu konunun klinik öneminin yeterince anlaşılmasına yol açmıştır (45). Bunun için VEGF/ VEGF reseptör sisteminin, EPO'nun aracılık ettiği anjiogenezdeki yerini anlayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Yinede insanlarda olduğu gibi farelerdeki serebral iskemi esnasında kan damarlarındaki EPO ve reseptörlerinin artan ekspresyonunun, hipoksik dokudaki yeni damar oluşumu ile ilişkili olması muhtemeldir (46).

Sıçanlarda hipokampal ve kortikal nöron kültürlerinde EPO-R ekspresyonu glutamat nörotoksitesine karşı EPO ve diğeri büyüme faktörlerinin yokluğunda da embriyonik nöronların sağkalımını artırır. EPO-R geninin direkt olarak HIF ile düzenlenmemesine rağmen hipoksi nöronlarda EPO-R ekspresyonunu uyarmakta ve EPO hassasiyetini arttırmaktadır (48).

EPO oligodendrosit progenitörlerin aktivasyonu ve oligodendrositlerin korunmasında rol oynar. EPO ve EPO-R oligodendrositlerde eksprese edilir ve kültür de oligodendrositler farklılaşması ve olgunlaşmasını sağlar (30).

İskemik inmeyi takiben 24. saatte intraperitoneal olarak EPO verilen sıçanlarda VEGF ve diğer beyin kaynaklı nöral faktörlerin seviyelerin de artış ile beraber anjiogenezis ve nörojenezis görülür. EPO iskemik bölgede anjiogenezis artırırken bu bölgeye nöroblast göçünü de arttırması bu iki olay arasındaki ilişkiyi gösterir.

Ayrıca son zamanlardaki hayvan modellerinde, EPO'nun miyokardı iskemik reperfüzyon hasarına karşı koruduğuda gösterilmiştir. Bu durum EPO'nun farklı dokularda hipoksik hasara karşı genel bir koruyucu rolünün olduğunu düşündürmektedir (49).

Sonuç olarak değişik nöronal hasar modellerinde elde edilen veriler EPO'nun nöron koruyucu etkilerini, apoptozu, kainik asit toksisitesini, nitrik oksit salınımını, inflamatuvar sitokinleri azaltarak, anjiogenik ve antioksidan etkiyi arttırarak gösterdiği tespit edilmiştir. Beraberinde bu çalışmalarda, EPO ile inme sonrası öğrenme güçlüğünün ve nörolojik fonksiyon kaybının azaldığı, infarkt alanının küçüldüğünde gözlenmiştir.

Hipoksiye cevap olarak beyinde endojen EPO artışının beyin korunmasını sağlamak için parakrin ve otokrin rolü olduğu gösterilmiştir. Eritroid progenitör hücreler üzerine etkisine benzer şekilde nöral progenitör hücrelerin sağkalımı ve çoğalmasını arttırır. Beyin iskemi ve travması oluşturulan hayvanlarda beyin koruyucu etkisinin olması beyin zedelenmesi ve hastalıklarında EPO tedavisini gündeme getirmiştir.

EPO'nun Klinik Uygulamaları

Deneysel, serebral iskemi, kafa yaralanması, nöbetler ve deneysel otoimmün ensefalomyelit gibi çeşitli sorunlardan sonra EPO'nun nöron koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Çeşitli iskemi modellerinde, orta serebral arter tıkanıklığı olan fare ve ratlardaki fokal serebral iskemi modellerinde EPO uygulamasının nöronları iskemik hasardan koruduğu, sinaps sayısını arttırdığı, iskemik nöronal hasarı direkt veya dolaylı olarak azalttığı görülmektedir (50-66).

İnme ve travmatik beyin zedelenmesinde EPO tedavisinin kan beyin bariyerinde geçisi problem oluşturmaz. KBB bozulduğu zaman EPO'nun beyine geçişi ve albumin seviyesinde artmaktadır. Örneğin sıçan inme modelinde 6. saate kadar albumin ekstravazasyonu olmaktadır ve ilk 24 sa de albumin geçişi 3,5 kat artmaktadır (35,36).

Araştırmaların sonucunda beyinde EPO ve EPO reseptör sisteminin bulunduğu, iskemik bir uyarı ile aktive olarak beyni korumaya çalıştığı tespit edilmiş ve endojen bir koruma faktörü olarak kabul edilmiştir. EPO son yıllarda yenidoğanın hipoksik iskemik ensefalopatisi ve nörolojik problemi olan erişkin hastaların tedavisinde ümit vaat etmektedir (50,55,62,67). Günümüzde, terapötik olarak yetersiz kalınan daha birçok hastalığın tedavisinde bu ajanın dışardan kullanımına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır (68-71).

VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VASCULAR ENDOTHELİAL GROWTH FACTOR; VEGF)

VEGF, 43-46 kDa ağırlılığında heparin bağlayan dimerik glikoproteindir. Endotel için yüksek hassasiyete sahip güçlü bir mitojendir (72). VEGF'in bilinen dört izoformu vardır. Bunlar aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF165, VEGF189,VEGF206 olarak ayrılmaktadırlar. İnsanlarda en fazla VEGF165 izoformu bulunmaktadır. Bu izomer, büyük oranda heparine bağlanarak salınmaktadır (72,73).

VEGF'in, endotel hücrelerinde üç farklı reseptörünün varlığı bilinmektedir. VEGF reseptörleri; Klass III tirozin kinaz reseptör ailesinden olup yedi Ig benzeri yapısı vardır. Felin sarkom virüs (fms) benzeri tirozin kinaz 1 (Flt-1) olan VEGFR-1 ekspresyonu genellikle endotel hücrelerinde görülmekte, vaskülogenezis ve anjiogeneziste rol oynamaktadır. Hipoksi endotel hücrelerinde VEGFR-1 ekspresyonunu indüklerken VEGFR-2 (Flk-1; fetal liver kinaz-1, KDR; Kinaz domain region)'yi etkilemez. VEGFR-2 pluripotent hematopoitik kök hücre, VEGFR-3 ise lenfatik damarlar için belirleyicidir. VEGFR3/Flt-4 ayrıca endotel venüller/ embriyonik prelenfatikler, bazı tümör damarları ve bazı hematopoitik ve lösemik hücrelerde tespit edilmiştir (73,74).

Vasküler gelişimin başlangıcında ve daha sonraki dönemlerde endotel hücreleri, çoğalabilmek için veya adezyon molekülleri sentezleyebilmek için bir takım büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Damar oluşumunda en kritik rolü VEGF oynamaktadır. VEGF ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlatığı için vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmişti (72).

Vasküler gelişimin başlaması için bir takım büyüme faktörlerine ihtiyaç vardır. VEGF ve b-FGF bunlardan en etkilidir. Özellikle VEGF'in veya reseptörlerinin yokluğunda; hem endotel, hem de hematopoitik öncül hücrelerinin farklılaşması

gerçekleşemediği için damarlar ve kan hücreleri oluşmamakta sonuçta erken embriyonik ölüm görülmektedir (75).

Embriyonun büyümesinin ileri aşamalarında, vaskülogenezis ile meydana gelen damarlar embriyonun gereksinimini karşılamaya yetmeyecek ve gerekli olan kan ihtiyacını sağlamak üzere ilk oluşan bu damarlardan yenileri gelişecektir. İlk damarlardan olan bu genişleme ve çoğalmaya anjiogenezis denir. Anjiogenezis; fetal yaşamda erişkinlerde menstrüel siklusta, yara iyileşmesinde ve tümör büyümesinde gözlenir (75). Vaskülogeneziste olduğu gibi anjiyogeneziste de VEGF, anjiopoietin-1, anjiopoietin-2 ve efrin- β 2 gibi büyüme faktörleri etkindir. Anjiogenezis, sağlıklı ergin erkeklerde minimal düzeydeyken, dişilerin menstrüel sikluslarında oldukça fazla gözlenir. Ovarian folliküllerin VEGF ekspresyonu ve neovaskülarizasyon ovulasyondan hemen önce artarken, ovulasyondan kısa bir süre sonra korpus luteum VEGF sentezine başlar (76). VEGF, erken implantasyon boyunca, implante olmuş embriyonel trofoblastlarca salgılanır.

VEGF'in Yapısı

VEGF ailesinin -A dan -E'ye kadar ve plasental büyüme faktörünü (Placenta growth factor; PlGF) de içine alan kan damarları ve lenf damarlarının oluşumu ve devamını sağlayan faktörlerden meydana geldiği gösterilmiştir (72-74).

VEGF-A'nın geni, makrofaj, T hücresi, astrosit, osteoblast, düz kas hücresi, fibroblast, endotel hücresi, kardiomyosit, iskelet kas hücresi ve keratinositlerde eksprese olur. Ayrıca başka bazı tümörlerde de ekspresyon gösterilmiştir. Şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bunlar VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 ve VEGF206 olarak isimlendirilmişlerdir. VEGF-A aleli veya VEGF-R2 genindeki bozukluk sonucu vasküler gelişim yetersizliği nedeniyle embriyonik hayatın 2. haftasında embrio ölümü gözükmektedir.

VEGF-B, 167 aminoasitli olup vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monosit aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır (72). VEGF-B'nin fare embriyosunda (14.günde) ekspresyonu en çok kalp ve sinir sisteminde olmaktadır (Nag).

VEGF-C, VEGF benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzer 388 amino asitten oluşmuştur (73). Lenfanjiogenezde rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve 3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar (72).

VEGF-D, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında benzeyen amino asitler içeren bir proteindir (Achen and Stacker, 1998). VEGFR-2 ve 3'e bağlanarak etki eder (70). VEGF-C ile benzer etkilere sahiptir (72).

VEGF-E, güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etki eden, uzunluk olarak VEGF165'e benzeyen ama VEGFR-1'e bağlanmayı başaramayan bir büyüme faktörüdür.

PIGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. VEGF-A ile %37 oranında benzeyen ve 152 amino asit içeren PIGF, VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (72).

VEGF'in Vücutta Dağılımı ve Ekspresyonu

Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenezis döneminde oldukça yükselir. Sıçan embriyosundun VEGF mRNA'sı farklılaşmamış desidua hücrelerinden ve implantasyondan sonra 1.gün gibi çok erken dönemde trofoblast öncülleri tarafından eksprese edilir (73). VEGF desidua ve plasentada endotel hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini stimule eder (74).

Fare ve sıçan embriyosunda daha geç dönemlerinde VEGF ve reseptörleri birçok organda eksprese olur. En yüksek ekspresyon akciğer, böbrek ve kalpte görülür.

Bundan başka VEGF mRNA'sı; yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (72). Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF mRNA'sının sentezlendiği gösterilmiştir.

VEGF mRNA transkripsiyonu çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Bunlardan birkaçı; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB, keratinosit büyüme faktörü, EGF, TNF- α , TNF- β ve IL- β 'dir. Bu faktörler endotel hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmişlerdir. Bu maddelerin hiçbirisinin mitojenik olmadığı, ancak VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (73).

Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür. Örneğin; Forbol esterlerinin insan keratinositlerinin sentezledikleri VEGF seviyelerini 5 kat arttırdıkları belirtilmiştir. Prostaglandin E₂'nin (PGE₂), osteoblastlardaki VEGF mRNA'sını arttırdığı da gösterilmiştir (77).

Hipoksi, belki de, angiogenezi başlatan en etkili uyarılardan birisidir. Düşük oksijen seviyesi, VEGF ve onun reseptörlerinin yapımını indükler. Aynı olay tümörlerin beslenemeyen hipoksik merkezlerinde de olmakta ve VEGF'ün aynı şekilde ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmiştir.

VEGF'in Etkileri

VEGF, vasküler sistem boyunca dizilmiş endotel hücreleri için bilinen en özgül mitojendir (72-74).

VEGF mitojenik aktivite dışında, vazopermeabilite faktörüdür. VEGF'in neden olduğu vasküler permeabilite artışı, kemotaksis ve inflamasyonun devamında önemlidir. Birçok inflamatuvar olayda VEGF düzeyi artmaktadır. VEGF'in salınımında en önemli iki faktör hipoksi ve inflamasyondur. Hipoksiye maruz bırakılan retina, VEGF düzeyinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

VEGF, hücre içi kalsiyum düzeyini artırarak, endotel hücrelerden von Willebrand faktörünün salınımını ve yapımını da artırıcı etkiye sahiptir.

VEGF, özellikle vasküler endotel hücreleri için özgül etkilere sahiptir. VEGF; embriyogenez, yara, iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan bir dizi fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki kan damarı oluşumundaki (angiogenezi ve vaskülogenezis) rolü yüzünden yoğun ilgi odağıdır (75).

Ayrıca, vasküler endotel hücrelerin non-mitojenik cevaplarından olan kemotaktik olaylara ve dokular içine doğru ilerleyecek kapillerlerin penetrasyonuna yardımcı olan kollajenaz ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonuna da yardımcı olur (78). VEGF'ün intradermal tek bir enjeksiyonu 5 dakika içerisinde vasküler bir sızıntı başlatır ve 15-20 dakika sonra da sona erer. Bunun aksine, VEGF'ün sürekli endojen parakrin ekspresyonu ise, ekspresyonun olduğu yere komşu pencereci endoteliumda (böbrekte ve beyin koroid pleksustaki gibi) sürekli bir vasküler permeabilite artışına sebep olabilir. Ancak, ne intravasküler olarak verilen VEGF ne de sağlam bir kan-beyin bariyeri içeren serebellar granül hücre tabakası gibi vaskülarize nöral dokularda eksprese olan VEGF vasküler sızıntıya neden olmaz. Buda göstermektedir

ki VEGF'ün indüklediği vasküler sızıntıyı henüz bilinmeyen başka maddeler de kontrol etmektedir (79).

In vivo modellerde VEGF'in eksikliği halinde vaskülarizasyonun gerilediği gözlenmiştir. Kemirgenlerin dermal yaralanmalarında, normal doku tamirinin ayrılmaz bir parçası olan anjiogenezis, yaralanmadan hemen sonra yüzeysel epidermal keratinositlerin salgıladığı VEGF tarafından uyarılır. Buna rağmen iyileşmenin bozulduğu diabetik kemirgenlerde, yeni damar oluşumu oldukça düşük seviyelerdedir. Eksojen VEGF, yeni damar oluşumunu indükler, iskemik tavşan ekstremitelerinde perfüzyonu artırır ve domuz koroner arterlerinde azalmış kan akımına cevap olarak yine kan perfüzyonunu artırır (72-74).

Bunun yanında, yükselmiş VEGF ekspresyonu bazı hastalıkların ilerlemesine sebep olabilir. Örneğin; devamlı büyüyen solid tümörlerin anjiogenezise bağımlı oldukları, bu yüzden bu tümör hücrelerinde VEGF'e ait mRNA'ların arttığı ve tümöre komşu endotel hücrelerinde de VEGF reseptörlerine ait mRNA'larının arttığı gösterilmiştir. Anti-VEGF antikorları canlı farelerde insan tümörlerinin büyümesini ve vaskülarizasyonu inhibe etmesine rağmen, hücre kültüründe tümör hücrelerinin büyümesini durduramamıştı. Bu yüzden de VEGF ekspresyonu ile oluşan tümör büyümesinin anjiogenezisin parakrin olarak stimülasyonunun bir sonucu olduğu ortaya çıkmaktadır (75).

VEGF'in Reseptörü Üzerine Etkileri

VEGF'in endotel hücresinde etki gösterebilmesi için öncelikle ona bağlanabilmesi gerekir. Bir başka deyişle, endotel hücreleri VEGF'den faydalanabilmek için onun bağlanabileceği özgül reseptörleri sentezlemesi gerekir. Bu reseptörler VEGF reseptör-1 (VEGFR-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2)'dir. Bunlar ilk defa erken embriyogenez sırasında sentezlenirler (72).

Bu iki reseptörün amino asitlerinin %44'ü ortaktır. Bu reseptörler yaklaşık 1300 amino asitten oluşur ve iki bölüm içerirler. Birinci bölüm, hücre içinde kalan ve tirozin kinazın etkinlik alanlarını içeren intrasellüler bölgedir. İkinci bölüm ise, hücre dışında (ekstrasellüler alanda) kalan tek kısa membran köprüleri dizisi ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet immüoglobülin benzeri yapıdan oluşmuştur.

VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu reseptörlerden yoksun domuz aortik endotel hücrelerine sadece VEGFR-2 kodlayan bir plazmid verildiğinde bu hücrelerin mitoz geçirdikleri ve kemotaksiste yer

aldıkları gösterilmiştir (73). VEGFR-1'e seçici olarak bağlanmış VEGF permeabiliteye ilaveten anjiogenezis ve normal endotel hücrelerde kemotaksis ve çoğalmayı uyarabilir (78). Ayrıca, VEGFR-2'yi aktive eden anti-idiotipik antikolar tümör anjiogenezisini de tetikleyebilirler (74).

İnsan umbilikal ven kültüründe VEGFR-2 aktivasyonunun anti-apoptotik etkiler için gerekli olduğu gösterilmiştir. PlGF'ün ise VEGFR-1'e kuvvetle bağlanarak etki ettiği ama VEGFR-2'ye bağlanmadığı gösterilmiştir. Bu da PlGF'nin endotel hücrelerinde direk mitojenik ve permeabilite artırıcı etkisinin olmadığı veya etkin olarak tirozin fosforillenmesinin eksik kaldığını göstermiştir (78,79). Yapılan çalışmalar VEGFR-1'in VEGF etki mekanizmasında önemli olan bir reseptör olmayıp, aksine tuzak ve yanıltıcı bir reseptör olduğunu göstermiştir. VEGFR-2 VEGF'nin etkilerine aracılık ederken, VEGFR-1 ise ya yanıltıcı olarak görev yapmakta, ya da VEGFR-2 aracılığıyla sinyalizasyonu baskılayarak negatif bir etki göstermektedir (72,74).

Embriyonik kan damarlarının gelişiminde VEGF'nin etkin rolü farelerde VEGF'nin sadece bir allelindeki bozukluğun bile, anjiogenezis ve yeni kan adacıklarının oluşumunda öldürücü etkileri olduğunu görülmesiyle kanıtlanmıştır (72). Farelerde yapılan çalışmalarda, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin aksaması vaskularizasyonu ve normal embriyonik gelişimi engeller. VEGFR-2'nin noksan veya bozuk ekspresyonunda farelerin hematopoietik prekürsörlere, farklılaşmış endotel hücrelerine ve organize kan damarlarına sahip olmadıkları görülmüştür. Bu da VEGFR-2'nin hem endotelial, hem de hematopoietik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu düşündürmektedir. Bunun aksine; VEGFR-1'in yapımındaki aksaklıklarda, olgun endotelial hücreler oluşabilmesine rağmen, aşırı genişlemiş ve yapısal bozukluklara sahip damarlar oluşmaktadır. Bu olay, hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde VEGFR-1'in rolünün olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda bir başka VEGF reseptörü daha bulundu ve VEGFR-3 adı verildi. Bu reseptörün özellikle lenfatik damarların anjiogenezinde rol alan VEGF-C ve VEGF-D'nin bağlandığı reseptör olduğu saptandı (72-74).

Sonuç olarak **VEGFR-1**, VEGF-A, VEGF-B, PlGF için özgüldür, **VEGFR-2** VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E için özgüldür; **VEGFR-3** ise VEGF-C ve VEGF-D için özgüldür.

VEGF'in Beyin Üzerindeki Etkileri

Nöral kök hücreler erişkin beyninin değişik bölgelerinden izole edilmiştir. Nörogenesis bu bölgelerde hormonlar, nörotransmitterler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri gibi değişik faktörlerce uyarılır. Bu faktörler aktive olduğu zaman, nöral kök hücreler zedelenmiş beyin dokusunu tamir ederler. Beyindeki yeni hücreler nöral kök hücrelerden kaynaklandığında yeterli kan sağlanması için yeni damarlar gereklidir. Bu yüzden yeni damar oluşumu ve anjiogenezisin anjioblastların göçü ve farklılaşması ile hücrelerin yeniden yapılanması için gerekli olduğu görülmektedir (80).

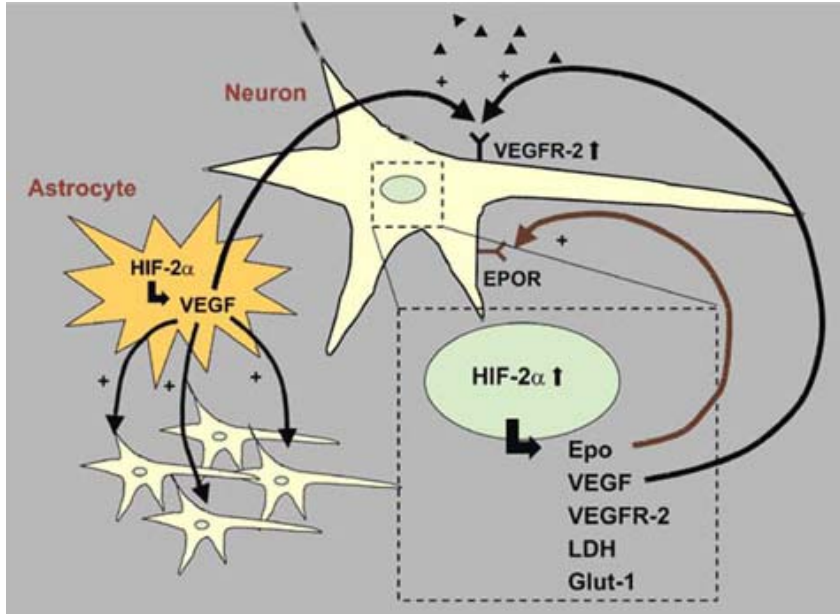
Sıçan hipokampal nöron kültüründe HIF-1 α aracılığı ile nöron, mikroglia/makrofajlar ve endotel hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır (81). VEGF kullanımı iskemi sonrası anjiogenezisi sağladığı için beyin dokusunu iskemiye karşı korumaktadır (82-87). Bununla birlikte, VEGF damar endotelinde fenestrasyonlar oluşturarak kan beyin bariyerinde zedelenmede yapabilmektedir (88). Erişkin fare beyninde hipokside VEGF artışı vasküler kaçağa neden olmaktadır. VEGF hipoksiye cevaben nöronların ve diğer hücrelerin sağkalımını bir proapoptotik proteaz olan kaspaz aktivasyonunun inhibisyonu ile yapmaktadır (90). Ek olarak, VEGF'in direkt nörotrofik etkileri de tanımlanmıştır (80).

VEGF İLE EPO İLİŞKİSİ

Memelilerde normal doku fonksiyonları yeterli oksijenlenmeye bağlıdır. Hipoksiye karşı hücrel, lokal ve sistemik seviyede adaptasyon mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmalar hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF-1 α) ve hipoksi ile düzenlenen genler (VEGF ve EPO) tarafından oluşturulur.

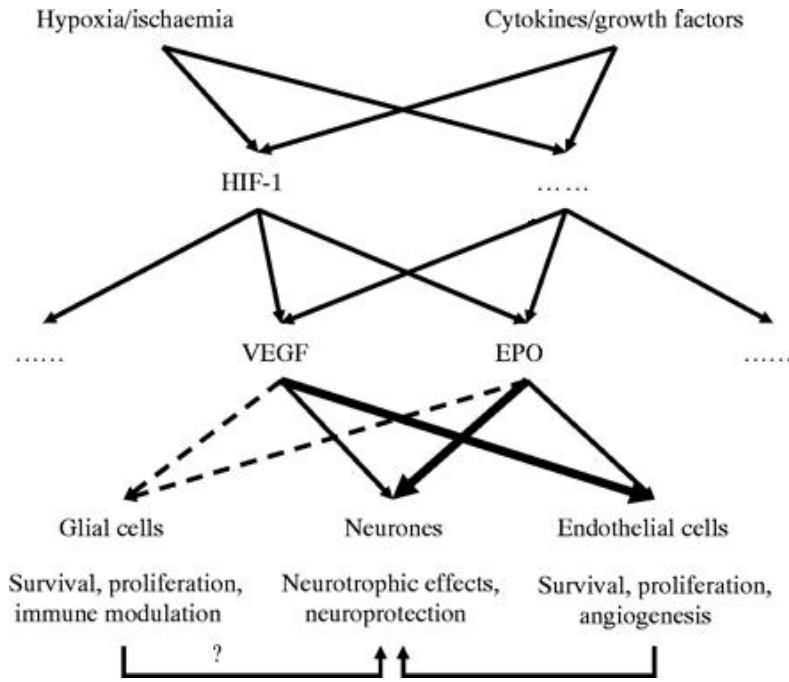
HIF anjiogenezis, vazomotor kontrol, enerji metabolizması, apoptozis ve eritropoiesisi de içine alan olaylarda önemli rol oynar. Aslında oksijen ile düzenlenen EPO ekspresyonu HIF-1 ile kontrol edilir (27-30,91). HIF-1 fizyolojik olarak hipoksik olaya yeterli ve hızlı bir şekilde cevap verir. HIF-1 glukoz transporter Glut 1, glikolitik enzimler, EPO ve VEGF'in ekspresyonunu düzenler. HIF-1, α ve β subünitesinden oluşan heterodimer bir faktördür. HIF-1 α hipoksik şartlarda çok hızlı stabilize olan oksijen labil bir proteindir. Stabilizasyonunda HIF-1 oksijen ile regüle olan VEGF ve EPO gibi genlerin spesifik DNA dizilerine bağlanır (32).

Ciddi hipoksi nedeniyle oluşan beyin iskemisinde VEGF dışında başka diğer mediatörlerinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu açıdan bakıldığında artmış beyin zedelenmesinde beyin EPO ekspresyonunun arttığı ve bu artışında birçok hücre tipi (nöron, endotel hücresi, glial hücre) tarafından düzenlendiği bilinmektedir (92). EPO ekspresyonu en yoğun hipokampus ve frontal kortekste bulunmaktadır. Bu bölgeler iskemiye karşı hassas alanlardır ve bu alanlarda da VEGF varlığı VEGF'nin EPO üretimi için hipoksik sinyal olarak rol oynadığını göstermektedir (26) (Şekil 4).



Şekil 4. Nöronlarda EPO ile VEGF ilişkisi

Doku hipoksisi ve serebral iskemi, EPO ve VEGF'nin aralarında bulunduğu çeşitli oksijenle regüle edilmiş faktörlerin gen transkripsiyonunu aktive eden HIF-1'i aktive eder. HIF-1, büyüme faktörleri veya sitokinler gibi hipoksiden-bağımsız uyarılar tarafından da aktive edilebilir. EPO için ana hedef (*kalın okla gösterilen*) nöronlardır. VEGF esas olarak apoptozisi önler, endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder ve yeni damar oluşumunu sağlar. EPO, endotel hücre proliferasyonuna daha az miktarda katkıda bulunur ve VEGF'de direkt nöron koruyucu faktördür (*ince oklarla gösterilen*). Ek olarak, hem EPO hem de VEGF nörotrofik özelliklere sahiptir. EPO ve VEGF için reseptörlerin mikroglial hücreler ve astrositlerde salınması nedeniyle, glial hücreler her iki faktör için de hedef olabilir, ancak bu hücreler üzerindeki etkileri açık değildir (*kesik oklarla gösterilen*) (92) (Şekil 5).



Şekil 5. Merkezi sinir sistemindeki hipoksinin uyardığı nöronal koruma mekanizmaları

Martinez-Estrada ve arkadaşları (36) çalışmalarında EPO'nun *in vitro* olarak VEGF'e bağlı permeabilite artışına karşı nöronları koruduğunu göstermişlerdir.

Bu bilgiler ışığında; VEGF tedavisini takiben hipokampus ve diğer beyin bölgelerinde artmış EPO ekspresyonu VEGF'nin direkt etkisi ile açıklanabileceği ön plana çıkmıştır. Bu mekanizma farklı patolojik durumlarda VEGF ve EPO'nun beyin koruyucu etkisinin sinerjistik olduğunu düşündürmektedir (92).

GEREÇLER ve YÖNTEM

Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklendi ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alınarak gerçekleştirildi. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Proje kodu: TT-06-19, Etik kurul onay numarası: 01/ 73.

Hayvan deneyleri 12 Eylül-07 Ekim 2007 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM), laboratuvar çalışmaları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Laboratuvarında yapıldı.

DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Bu çalışmada DEKAM'da yetiştirilen Wistar albino türü dişi sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21°C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı. Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları (30 dişi ve 20 erkek sıçan) DEKAM'dan sağlandı. Dişi sıçanlar çiftleştirilerek embriyoları kültür ortamında kullanılırken, hem dişi hem de erkek ratların kanları alınarak kültür ortamı için serum elde edildi.

Sıçanlar polyestrous'dur ve ovulasyon doğal bir şekilde oluşur. Sıçanların estrus siklusu 4 ya da 5 gün sürer. Hayvanlar karanlık periyodun ortasında çiftleşmeye meyillidirler (61). Döllenme yeteneği olan erkeklerle, 150-250 gr ağırlığındaki 4-10

aylık dişiler bir kafese konulmadan önce vajinal smear alınarak estrus siklusuna bakıldı. Estrus ve proestrus periyodundaki dişiler bir gece boyunca (saat 17.00 ile 9.00 arası) erkek sıçan ile aynı kafeste tutuldu. Sabah erkeklerden ayrılan dişilerden tekrar vajinal smear alınarak sperm olup olmadığına bakıldı. Vajinal smearde sperm görülen dişiler 0.5 günlük hamile olarak kabul edildi ve ayrı bir kafese alınıp normal diyet ile beslenerek 9 gün bekletildi.

ÇALIŞMA GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmamız biri kontrol dördü deney grubu olmak üzere toplam 5 grup üzerinde gerçekleştirildi.

1. **Kontrol grubu:** Sadece WRS (Whole rat serum: total rat serumu) kullanıldı.
2. **Hipoksi grubu:** WRS'deki embriyolara hipoksi (1. gün %5, 2. gün %5, 3. gün %40 oranında O₂ içeren gaz karışımı) uygulandı.
3. **EPO1 grubu:** Hipoksi oluşturulan embriyoların ortamına 200Ü/ml rHuEPO ilave edildi.
4. **EPO2 grubu:** Hipoksi oluşturulan embriyoların ortamına 100Ü/ml rHuEPO ilave edildi.
5. **EPO3 grubu:** Hipoksi oluşturulan embriyoların ortamına 50Ü/ml rHuEPO ilave edildi.

EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Kültür Ortamının (Serum) Hazırlanması

Dişi veya erkek sıçanlar eter ile anestezi kutusunda uyutuldu (Resim 1A-B). Anestezinin gerçekleştiği göz refleksi ile kontrol edildikten sonra hayvanlar anestezi kutusundan çıkarılarak düz bir sırt üzerine sırt üstü yatırıldı (Resim 1C). Anestezinin devamı için içinde eter ile ıslatılmış pamuk ihtiva eden bir cam kavanoz hayvanın burun kısmı içinde olacak şekilde baş kısmına yerleştirildi ve karın duvarı %70'lik alkol ile temizlendi. Pens ve makas yardımıyla hayvanın karnında V şeklinde kesi yapılarak deri baş hizasına katlandı (Resim 1D). Karın içi organlar bir tarafa itilerek abdominal aorta görünür hale getirildi. Aortun çatallanma yerinden 10 cc'lik enjektör yardımıyla giriş yapılarak alınabildiği kadar kan alındı (yaklaşık 8-10 cc). Kan alınır alınmaz 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra steril Pasteur pipeti ile serum çekildi ve kültür şişesine kondu. Sonra 56°C'ye

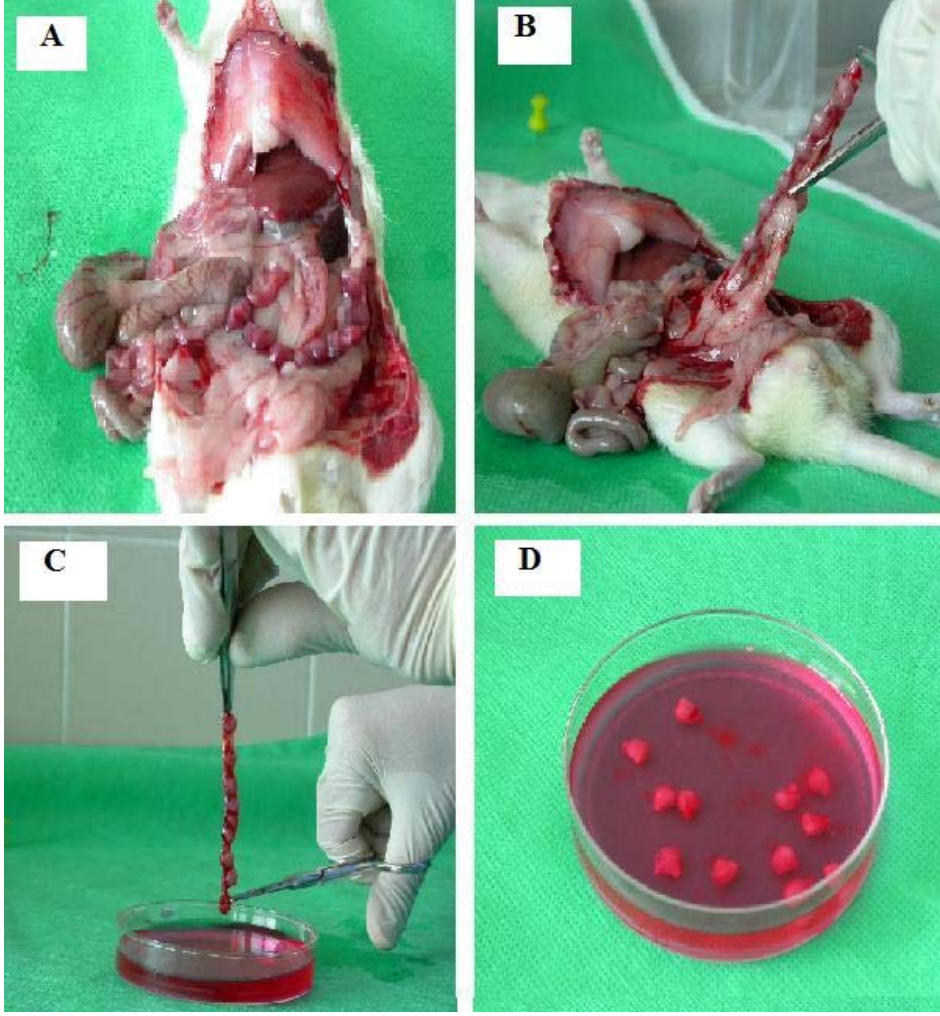
ayarlanmış olan su banyosunda 30 dk bekletildi. Su banyosunda bekledikten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Serumun miktarına göre 100 IU/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin eklendi (1 cc'lik seruma 10µl streptomisin /penicilin). Serum hazırlandıktan sonra -20°C'ye kondu. Serum kullanılacağı zaman su banyosunda 37°'de bekletilerek kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 1. Dişi ve erkek sıçanlardan serum için kan alımı. A- anestezi altındaki dişi sıçanın görünümü, B- anestezi etkisini gösterdikten sonraki dişi sıçanın görünümü, C- Dişi sıçanın sırt üstü yatmış hali, D- Aort'un çatallanma yerinden kan alınması

Embriyoların Anne Karnından Çıkarılışı ve Kültürü

Gebeliklerinin 9.5'uncu gününde dişi sıçanların karın ön duvarı anestezi altında açılıp içerisinde embriyo içeren, sayıları 8-15 arasında değişen keselerin oluşturduğu uterus disseke edilerek bu keseler tek tek kesilip içerisinde Hanks solüsyonunun bulunduğu steril petri kabına kondu (Resim 2).



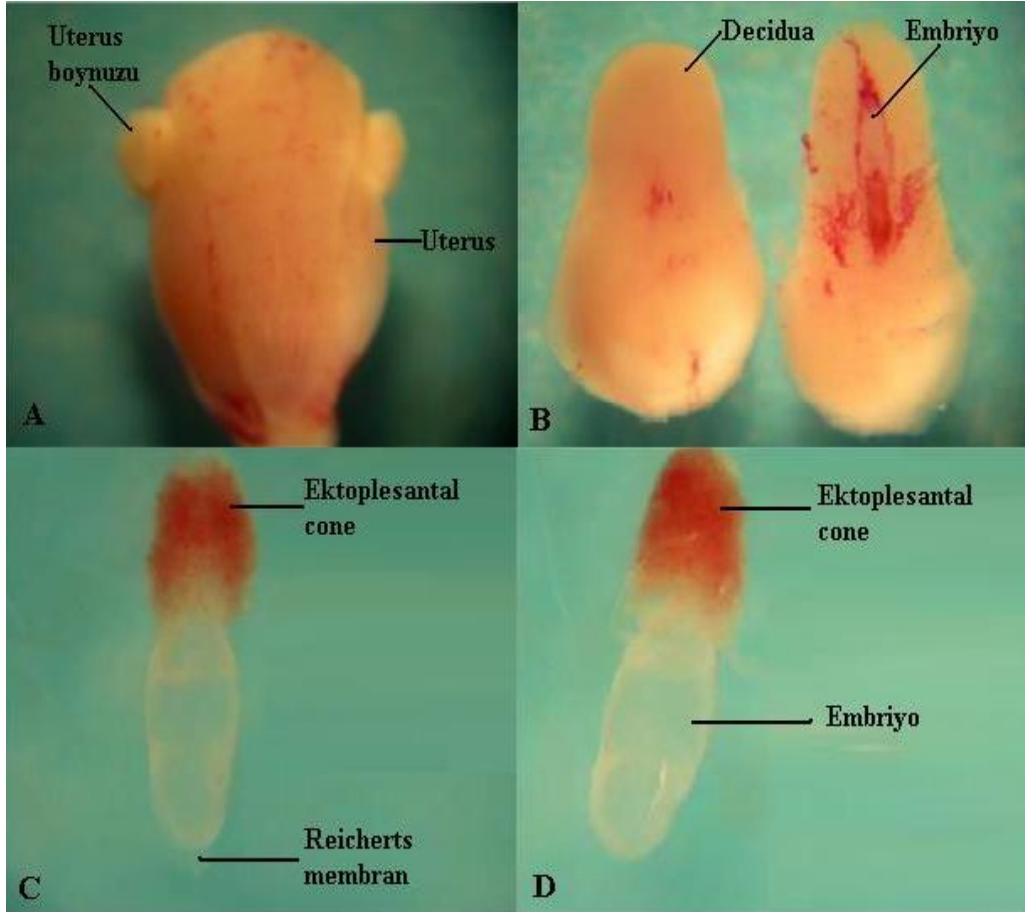
Resim 2. Gebe sıçanlardan embriyoların çıkarılışı. A-Karın içinde embriyoların görünümü, B- Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü, C- Embriyoların uterus boynuzundan çıkarıldıktan sonra Hanks solusyonuna transferi, D- Hanks solusyonu içindeki embriyoların görünümü

Bu aşamadan sonraki tüm işlemler 'lamin-air flow' kabin içerisinde yarı steril şartlarda ve stero mikroskop altında gerçekleştirildi (Resim 3).

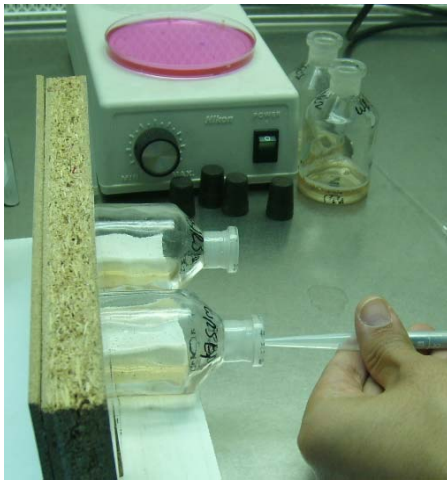


Resim 3. Oksijen tüpleri ve lamin-air flow

Steril forceps yardımıyla uterus kas tabakası (Resim 4A) ve decidua çıkartılıp (Resim 4B), decidua ikiye ayrılarak bir yüzünde yerleşmiş olan embriyoya zarar vermeden özen gösterilerek embriyo deciduadan ayrıldı (Resim 4C). Kemirgenlerde bulunan ve embriyoyu çepeçevre kuşatan Reicherts membranı embriyonal kutupta pens yardımıyla parçalanarak çıkartıldı (Resim 4D). Reichert's membran visseral endodermi sıkıca saran ve pariyetal endoderm tarafından sekrete edilen nonselüler bir membrandır. Reichert's membran kültürde büyür, bu yüzden kültür başlamadan önce çıkarılmalıdır.



Resim 4. Embriyoların ekstraembriyonik dokudan çıkarılışı. A- Uterus parçası, B- Decidua, C- Reicherts membranlı embriyo, D- Reicherts membranı çıkartılmış embriyo



Resim 5. Embriyolara gaz verilmesi



Resim 6. Roller inkübatör

Embriyo Hanks solüsyonu içeren küçük steril petri kabına kondu ve bu işlem bütün embriyolar için tekrarlandı. Bu aşamada zarar gören, gelişimi geri ya da anormal görünümlü olduğu saptanan embriyolar kültür ortamına konulmadı. Sağlam embriyolar beşerli gruplara ayrıldı ve içerisinde 5ml normal sıçan serumu bulunan 50cc'lik steril cam kültür şişelerine (1 embriyo/1 ml serum) steril bir cam Pasteur pipeti yardımıyla kondu. Kültür ortamına öncelikle hipoksi sonrası ilaç verilecek gruba uygun konsantrasyonlarda (200, 100, 50 Ü/ml) rHuEPO ilave edildi. Embriyo bulunan şişelere % 5'lik O₂, % 5'lik CO₂, % 90'luk N₂ (1. gaz karışımı) gaz karışımı 1dk süre ile verildi ve böylece embriyoların oksijen gereksinimleri karşılanmış oldu (Resim 5). Şişenin ağzı mantar tıpa ile kapatıldı. Kültür şişeleri 37°C'lik inkübatöre kondu (Resim 6). Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30 rpm/dk) dönen rollere yerleştirildi. Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden alınarak plastik tıpaları açıldı ve kontrol grubu % 20 O₂, % 5 CO₂, % 75 N₂ ihtiva eden (2. gaz karışımı) gaz karışımı ile 1 dk süre ile gazlanarak kültür şişeleri tekrar inkübatöre kondu. Hipoksi oluşturulacak grup ise % 5'lik O₂, % 5'lik CO₂, % 90'luk N₂ (2. gaz karışımı) gaz karışımı birinci güne benzer uygulandı. Embriyoların morfolojik değerlendirmelerinin yapılacağı son gün ise 44. saatte (skorlamadan 4 saat önce) embriyolara % 40 O₂, % 5 CO₂, % 55 N₂ (3. gaz karışımı) gaz karışımı ile şişelere 1 dk süre ile tekrar gaz verildi ve kültür süresi 48 saat olunca embriyolar içerisinde Hanks solüsyonu bulunan petri kaplarına transfer edildi. Van Meale-Fabry ve arkadaşları (28) tarafından geliştirilen Morfolojik skorlama sistemine göre mikroskop altında değerlendirildi. Varyasyonları en aza indirmek için çalışmada baş-kıç uzunluğu 1.5±0.3 mm olan embriyolar kullanıldı. Çalışmacılar arası skorlamadan doğabilecek yanlışlıkların önüne geçmek için embriyolar 3 gözlemci tarafından değerlendirildi. Kontrol ve hipoksi grubunda morfolojik skoru 1'nin altındaki embriyolar zedelenmiş olduğu düşünülerek çalışmaya dâhil edilmedi.

Embriyoda Hipoksi Oluşturulacak Gaz Karışımının Belirlenmesi

Gaz karışım oranlarını belirlemek için ön çalışma yapıldı. Bu amaçla önce toplam 10 embriyo üzerinde üç gün %5 O₂ içeren gaz karışımı verildi. Embriyolar değerlendirildiğinde skorlama yapılacak düzeyde gelişim olmadığı görüldü. Takiben yine toplam 10 embriyo üzerinde ilk 2 gün %5 daha sonraki gün %20 O₂ içeren gaz karışımı kullanıldı. Bu seferde tam olarak değerlendirme yapılacak gelişim görülmedi. Tüm skorlar 0-1 arasında idi. Takiben ilk 2 gün %5 daha sonraki gün

%40 O₂ içeren gaz karışımı kullanıldığında değerlendirme yapılacak düzeyde gelişim görüldü.

Embriyoya Verilecek rHuEPO Dozunun Belirlenmesi

Çalışmada uygulanacak rHuEPO dozunu belirlemek için de ön çalışma yapıldı. Embriyo kültüründe uygulanacak EPO dozuna dair çalışma bulunamadı. Hücre kültüründe Lewczuk ve arkadaşlarının (30) yaptığı çalışma temel alınarak embriyo kültüründe uygulanacak doz hesaplandı. Kültür ortamına 100 pm EPO (100Ü) konulmuştu. Ön çalışmada bu dozun iki üst ve iki alt dozu da alınarak uygun olabilecek doz araştırıldı. Bu amaç ile 300, 200, 100, 50 ve 10 Ü/ml dozunda EPO verildi. EPO dozu olarak 300 ve 10 Ü/ml verilen embriyolarda skorlama yapacak düzeyde gelişim gözlenmedi.

Tüm çalışmada toplam 49 embriyo kullanıldı. Çalışmamız üç ayrı aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada her bir grupta 5'er embriyo olmak üzere toplam 15 embriyo kullanıldı. İkinci ve üçüncü aşama 15 gün arayla aynı işlemin tekrarlanmasıyla gerçekleştirildi. Böylelikle kontrol ve deney gruplarında kullanılan embriyolar 10'a tamamlandı.

EMBRİYO BEYİN DOKUSUNUN EKSTRAKİYONU VE REAL-TİME RT-PCR İLE VEGFR-1, VEGFR-2 VE VEGFR-3 MRNA EKSPRESYONLARININ TESPİTİ

Elde edilen beyin dokularından hazır kit kullanılarak total RNA izole edildi (Mo-Bio, RNA izolasyon kiti). Total RNA'dan (2µg) komplementer DNA (cDNA) eldesi için First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Life Sciences) kullanılarak reverse transkripsiyon (RT) polimeraz chain reaction (PCR) yapıldı. Kantitatif real-time PCR 'Bio-Rad İCycler IQ' sistemi kullanılarak yapıldı. Elde edilen cDNA'larda intron-spanning primerler kullanılarak VEGFR-1,2,3 (hedef gen) ve GAPDH (Glukoz altı fosfat dehidrojenaz, referans gen) ekspresyonu analiz edildi. Sıçanlar için VEGF-R reseptörlerinin ve housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH primerleri Maurer ve ark. (2003) çalışmasından elde edildi.

Primer dizeleri : VEGFR-1 (sense 5'-TTCCGGACTTTCAACACCTC -3' ve antisense 5'-CCGAATAGCGAGCAGATTTC-3'), VEGFR-2 (sense5'-CGATGT

CTCCTCCATCGTTT-3' ve antisense 5'-TTCCATCCGGAACAAATCTC-3'), VEGFR-3 (sense 5'-TAAGGTGTACACCACGCAGA-3' ve antisense 5'-TGAGCTCTGAGAACTGTGCA-3') ve GAPDH (sense 5'-GAGGACCAGGTTGTCTCC TG-3' ve antisense 5'-GGATGGAATTGTGAGGGAGA-3') olarak seçildi.

Kalıp cDNA'lar (2µl); 25 l İQ SYBR Green Supermix ve her bir primerden 50 pmol içeren 50µl'lik PCR reaksiyonunda çoğaltıldı. Hedef ve referans genin her ikisine de 35 döngü PCR reaksiyonu uygulandı; Referans gen (**GAPDH**) için denatürasyon 94°C'de 5dk ve her bir döngü için 94°C'de 30sn, annealing 56°C'de 50sn, ekstensiyon 72°C'de 1 dk (toplam 35 döngü), ve son siklustan sonra final ekstensiyon için 72°C'de 120 sn; hedef genlerden **VEGFR-1** için denatürasyon 95°C'de 3dk ve her bir döngü için 95°C'de 30sn, annealing 60°C'de 50sn, ekstensiyon 72°C'de 45sn (toplam 37 döngü) ve final ekstensiyon için 72°C'de 3dk; **VEGFR-2** için denatürasyon 94°C'de 5dk ve her bir döngü için 94°C'de 30sn, annealing 56.5°C'de 50sn, ekstensiyon 72°C'de 50sn (toplam 35 döngü) ve final ekstensiyon için 72°C'de 2dk; **VEGFR-3** için denatürasyon 95°C'de 3dk ve her bir döngü için 95°C'de 30sn, annealing 61.5°C'de 50sn, ekstensiyon 72°C'de 45sn (toplam 37 döngü) ve final ekstensiyon için 72°C'de 3dk floresan data 585nm dalga boyunda ve her siklusun 72°C'lik ekstensiyon fazında Real-Time PCR optik sistemi tarafından kaydedildi. Ürünlerin spesifitesi 'melt curve analysis' ve %1.5 agaroz jel elektroforezde koşturarak test edildi (GAPDH için PCR baz bantı 297 bp, VEGFR-1 için 180 bp, VEGFR-2 200 bp için, VEGFR-3 300 bp için) (Şekil 6). Ekspresyon oranları hesaplanırken 'Bio-Rad İCycler İQ' tarafından sağlanan özel yazılım programı kullanıldı.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Şekil 6. GAPDH ve VEGFR PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

1-10. DNA boyut marker

2-3. kuyucuk: Beyin dokusunun GAPDH PCR ürünü

4-5. kuyucuk : Beyin dokularının VEGFR-1 PCR ürünü

6-7. kuyucuk : Beyin dokularının VEGFR-2 PCR ürünü

8-9. kuyucuk: Beyin dokularının VEGFR-3 PCR ürünü

Kontrol ve hipoksi beyinlerinden rastgele seçilen birer örnek kullanılarak hem hedef gen hem de referans gen için farklı standart eğri elde edildi.(1 üniteden 1/16 üniteye kadar 5 konsantrasyon kullanıldı). Standart eğriler üzerinden her örneğin eşik siklusu (CT) kullanılarak hedef referans genlerin ünite cinsinden relatif konsantrasyonlar hesaplandı. Örnekler arasındaki RNA kalite ve kantite farklılıklarını düzeltmek için VEGFR-1, -2, -3 relatif konsantrasyonu, GAPDH relatif konsantrasyonuna bölünerek normalize oranlar elde edildi. Elde edilen normalize oranlar kontrol, hipoksi ve EPO grubunun beyin dokusudaki VEGFR-1, -2, -3 ekspresyonları olarak değerlendirildi. Çalışmada kontrol, hipoksi ve hipoksi grubuna EPO verilmesi nedeniyle değerler normal kontrol ve hipoksi kontrol temel alındığı için her bir ekspresyon için iki adet değer elde edildi (VEGFR-1 normal (N) ve hipoksi (H); VEGFR-2 normal (N) ve hipoksi (H); VEGFR-3 normal (N) ve hipoksi (H)). Kontrol ve hipoksi karşılaştırmalarında

kontrol grubunun standart alındığı, hipoksi grubu ile deney grubunun karşılaştırılmasında ise hipoksi grubunun standart alındığı değerler kullanıldı.

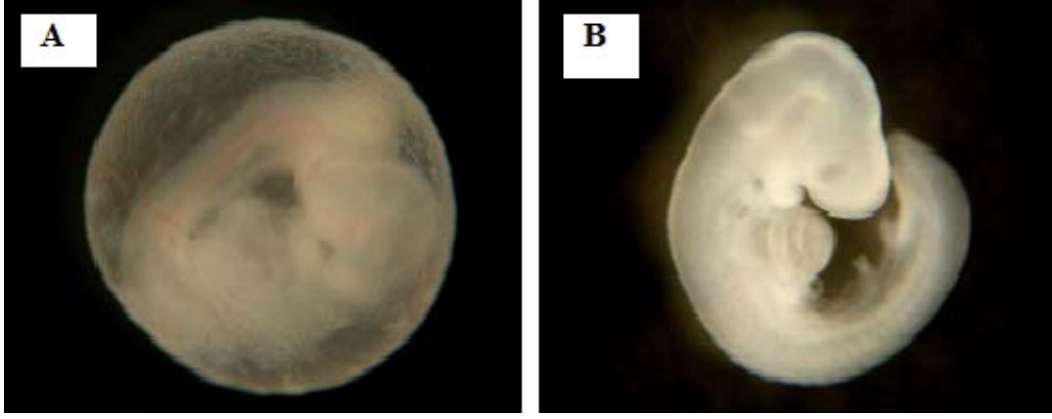
İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 15.0 ile Sigma Stat 3.1 istatistik paket programlarından yararlanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren parametreler ortalama \pm SD, anormal dağılım gösteren parametreler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde beş grup olduğu için gruplar arası karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Pos Hoc hangi testin yapılacağını belirlemek için varyansların homojenitesine (Levene testi) bakıldı. Grupların karşılaştırılması varyansların homojen olduğu verilerde Tukey testi, homojen olmadığı verilerde Tamhane testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise beş grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H Testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis H Testi sonucu fark çıkan grupların karşılaştırılması Dunn's Yöntemi ile yapıldı. Parametreler arası ilişki araştırılırken normal dağılım gösteren parametrelerde Pearson korelasyon katsayısı, anormal dağılım gösteren parametrelerde Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

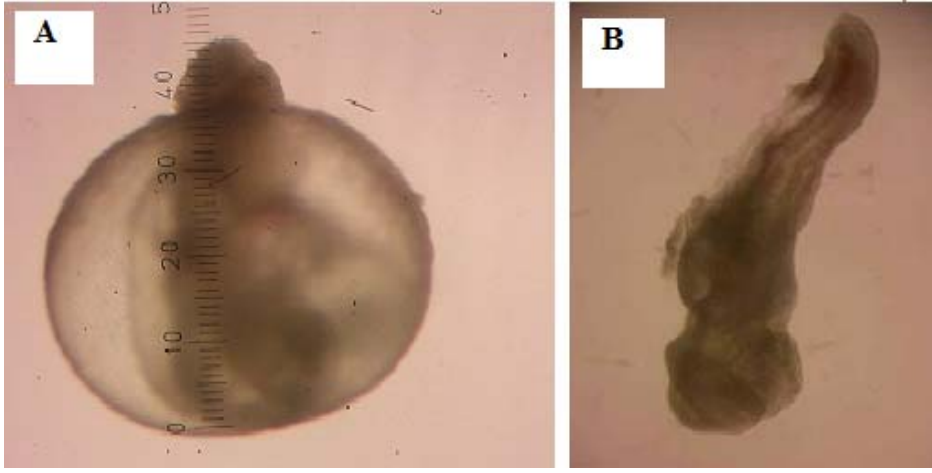
BULGULAR

GRUPLARIN MORFOLOJİK SKORLAMA VERİLERİ

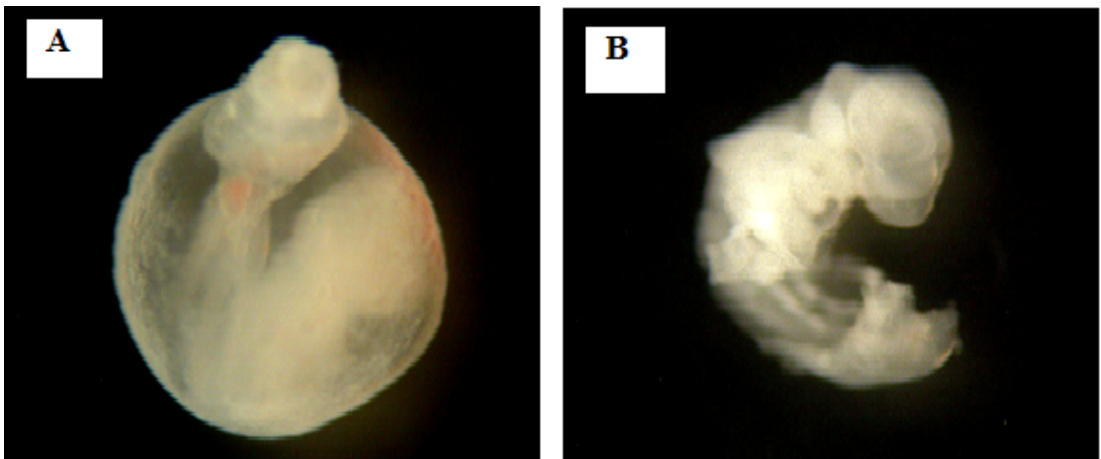
Morfolojik skarlama sistemine göre 11,5 günlük embriyoların 48 saatlik kültür periyodu sonunda kontrol grubunu oluşturan embriyoların normal *in vivo* gelişimine yakın bir gelişme gösterdiği gözlendi (Resim 7). Embriyonik gelişimdeki en belirgin gerileme hipoksik grupta gözlendi (Resim 8). Deney gruplarında ise hipoksi grubuna göre morfolojik skarlama değerlerinde artış olduğu gözlendi (Resim 9).



Resim 7. Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük sıçan embriyoları A-Vitellus kesesi çıkartılmamış embriyo B- Embriyonun yandan görünüşü (EPO1 grubunda benzer).



Resim 8. Hipoksi sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellus kesesi çıkartılmamış embriyo B- Embriyonun yandan görünüşü



Resim 9. Kültür ortamına 50 ve 100Ü/ml EPO ilave edildikten sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellus kesesi çıkartılmamış embriyo B- Embriyonun yandan görünüşü

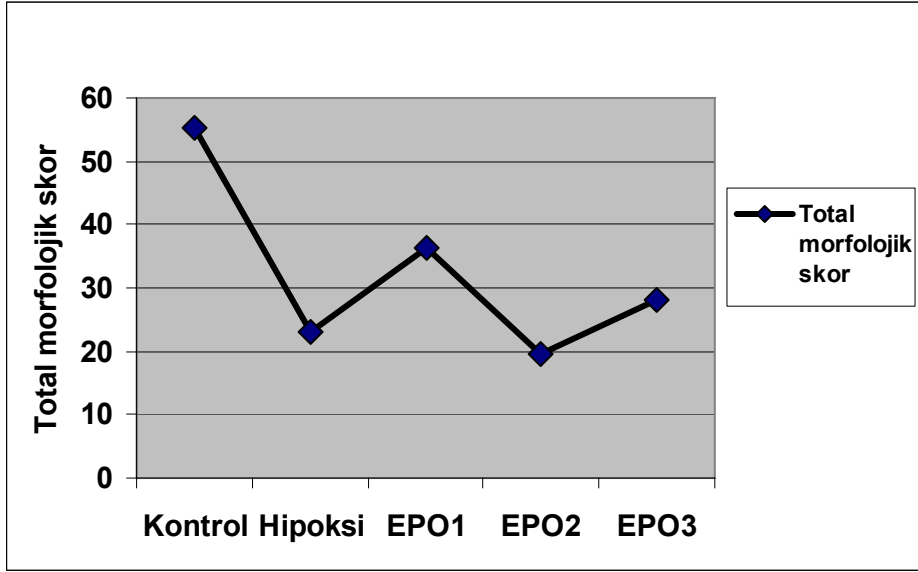
Morfolojik skorlama sistemine göre toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı karşılaştırıldığında kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo II).

Tablo II. Gruplara göre normal dağılım gösteren morfolojik skorlama verileri

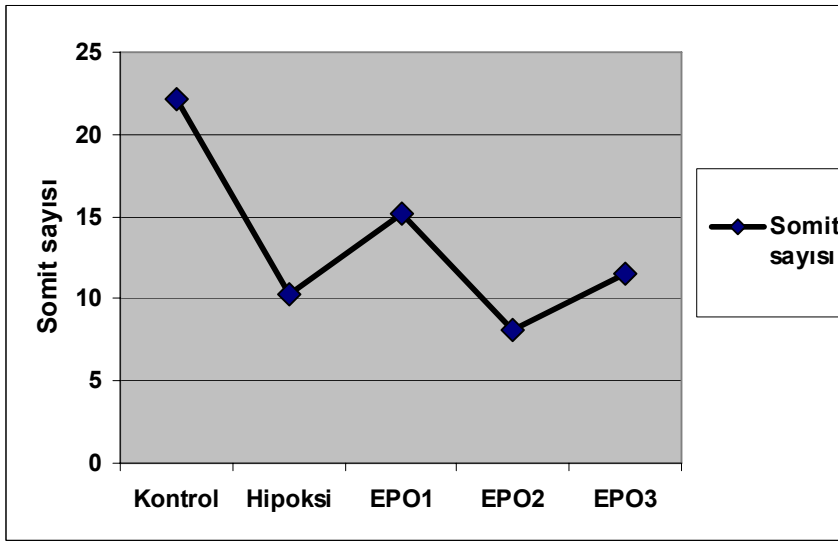
Değişkenler	Kontrol (n:10)	Hipoksi (n:10)	Hipoksi+EPO grubu			P değeri
			EPO1 (n:10)	EPO2 (n:10)	EPO3 (n:9)	
Total morfolojik skor	55.30±7.22	23.0±4.61 a	36.20±5.07 a,b	19.70±5.07 a,c	28.10±13.5 a	<0.05
Somit sayısı	22.10±3.78	10.30±3.59 a	15.29±2.30 a,b	8.10±2.55 a,c	11.56±5.70 a	<0.05
Ortalama Vitellus kesesi çapı	5.70±0.38	5.08±0.66	4.36±1.20	5.02±0.85	4.70±0.54 a	<0.05
Baş-kıç uzunluğu	4.84±0.63	2.78±0.58 a	2.69±0.41 a	2.48±0.33 a	2.91±0.46 a	<0.05

a $p<0.005$; kontrol grubu ile kıyaslandığında **c** $p<0.005$; EPO1 grubu ile kıyaslandığında
b $p<0.005$; hipoksi grubu ile kıyaslandığında

Total morfolojik skor ve somit sayısı açısından; kontrol grubu ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülürken EPO1 grubunun değerleri hipoksi ve EPO2 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo II) (Şekil 7-8).

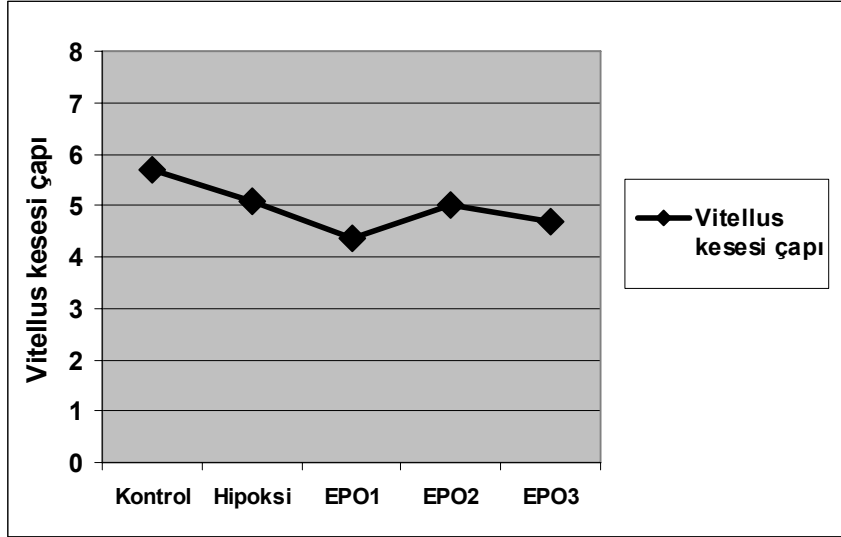


Şekil 7. Grupların total morfolojik skor değerleri

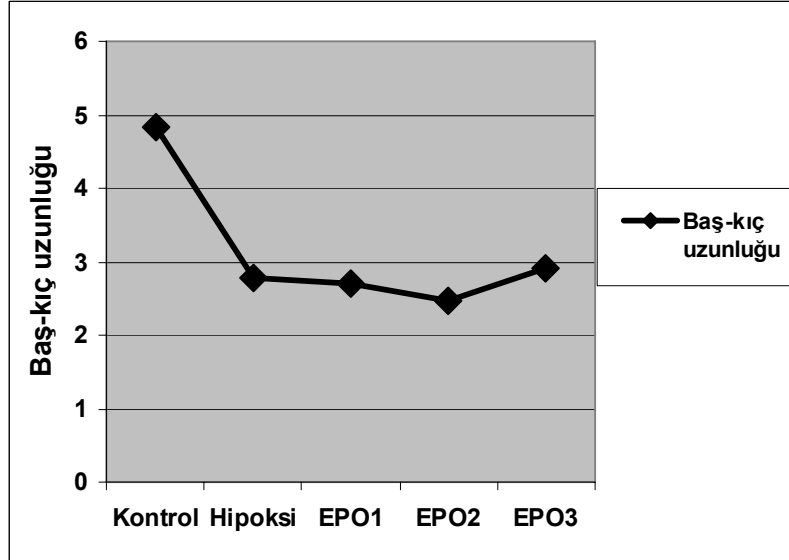


Şekil 8. Grupların somit sayısı değerleri

Ortalama vitellus kesesi çapı açısından sadece kontrol ile EPO3 arasında fark varken, **baş-kıç uzunluğu açısından** kontrol grubu diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo II) (Şekil 9-10).



Şekil 9. Ortalama vitellus kesesi çapının gruplardaki değerleri



Şekil 10. Grupların baş-kıç uzunluğu değerleri

Parametrik dağılım göstermeyen beyin skoru, vitellus kesesi dolaşımı, allantois, fleksiyon, kalp, kaudal nöral tüp, arka/orta/ön beyin, otik, optik, olfaktör, ön ve arka ekstremite, brankial, mandibular ve maksiller sistem değerlendirilmesinde; kontrol grubu ile hipoksi, EPO2 ve EPO3 grupları arasında anlamlı olarak fark var iken kalp gelişimi, kaudal nöral tüp, otik ve optik sistem, mandibular ve arka ekstremite gelişiminde ek olarak EPO1 değerleri EPO2 değerlerinden anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$) (Tablo III).

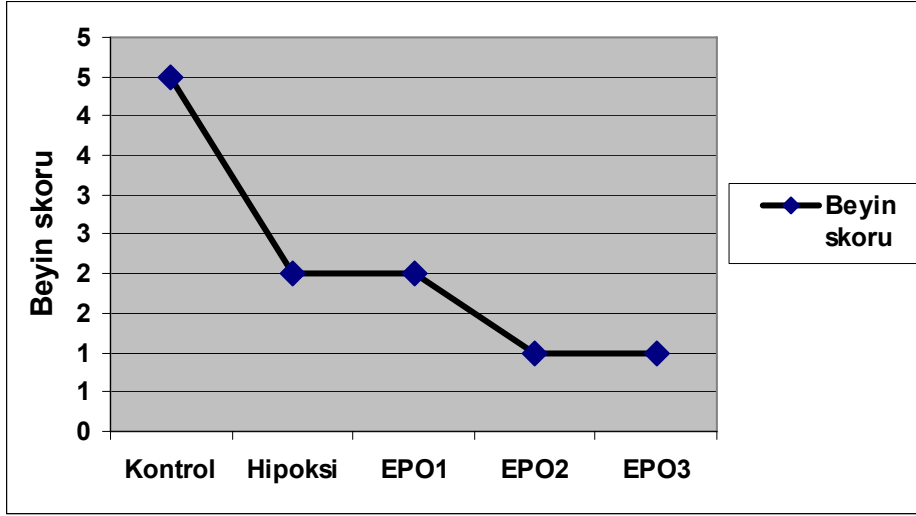
Tablo III. Gruplara göre normal dağılım göstermeyen morfolojik skorlama verileri

Değişkenler	Kontrol (n:10)	Hipoksi (n:10)	Hipoksi+EPO grubu			P değeri
			EPO1 (n:10)	EPO2 (n:10)	EPO3 (n:9)	
Beyin skoru	13.5 (9-15)	3.0 (3-6) a	6.0 (6-10)	3.0 (3-6) a	6 (3-15)	<0.05
Yolk sak dolaşımı	4.0 (3-5)	1.0 (1-2) a	2.0 (1-4)	1.0 (1-2) a	2.0 (1-4)	<0.05
Allantois	3.0 (3-3)	1.0 (1-2) a	2.0 (1-3)	1.0 (1-2) a	2.0 (1-3) a	<0.05
Fleksiyon	5.0 (4-5)	1.0 (1-2) a	3.0 (2-3) b	1.0 (1-2) a	2.0 (1-5) a	<0.05
Kalp	4.0 (2-5)	2.0 (2-3) a	3.0 (3-3)	2.0 (2-2)a,c	2.0 (2-4) a	<0.05
Kaudal nöral tüp	4.0 (3-5)	2.0 (1-2) a	3.0 (2-3)	1.0 (1-2)a,c	2.0 (1-3) a	<0.05
Arka/orta/ön beyin	4.5 (3-5)	1.0 (1-2) a	2.0 (2-3)	1.0 (1-2) a	1.0 (1-2) a	<0.05
Otik sistem	4.0 (3-5)	2.0 (1-2) a	3.0 (2-4)	1.0 (1-2)a,c	2.0 (1-4) a	<0.05
Optik sistem	4.0 (3-5)	2.0 (1-2) a	3.0 (3-3)	1.0 (1-2)a,c	2.0 (0-4) a	<0.05
Olfaktör sistem	2.0 (2-2)	1.0 (1-1) a	1.0 (1-4)	1.0 (1-1) a	1.0 (0-2) a	<0.05
Brankial	2.0 (1-2)	1.0 (0-1) a	1.0 (1-2)	1.0 (0-4)	1.0 (0-2)	<0.05
Mandibular	2.0 (2-2)	2.0 (1-2) a	2.0 (2-2)	1 (1-1)b,c	2.0 (1-2)	<0.05
Maksiller	2.0 (1-3)	1.0 (0-1) a	1.0 (1-2)	1.0 (0-1) a	1.0 (0-2) a	<0.05
Ön eksremite	1.5 (1-2)	1.0 (1-1)	1.0 (1-2)	1.0 (1-1)	1.0 (1-2)	>0.05
Arka ekstremitte	1.0 (1-2)	1.0 (1-1) a	1.0 (1-1)	0(0-1)b,c	1.0 (0-1)	<0.05

a p<0.005; kontrol grubu ile kıyaslandığında c p<0.005; EPO1 grubu ile kıyaslandığında
b p<0.005; hipoksi grubu ile kıyaslandığında

Beyin skoru ve kaudal nöral tüp gelişiminde; kontrol grubunun değerleri hipoksi, EPO2 ve EPO3 değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu

($p < 0.05$, Tablo III) (Şekil 10). EPO1 grubunun kaudal nöral tüp gelişim değeri EPO2 grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$) (tablo III) (Şekil 11).



Şekil 11. Grupların beyin skoru değerleri

Beyin gelişimi değerlendirildiğinde EPO1 grubunun değerlerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (Tablo IV).

Tablo IV. Kontrol grubu ile deney grubunun beyin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik skor				
		1	2	3	4	5
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	1	4	5
Hipoksi	10	7	3	-	-	-
200 Ü/ml EPO1 (Deney grubu)	10	-	6	4	-	-
100 Ü/ml EPO2 (Deney grubu)	10	6	4	-	-	-
50 Ü/ml EPO3 (Deney grubu)	10	7	3	-	-	-

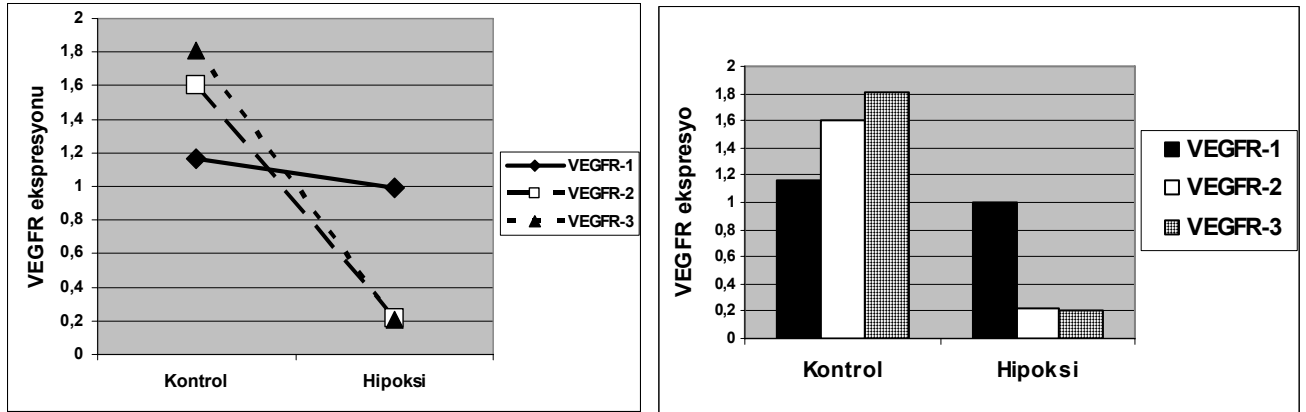
GRUPLARIN VEGFR EKSPRESYON VERİLERİ

VEGFR ekspresyonu verilerinde kontrol grubu standart alındığındaki değerler (VEGFR-1N, VEGFR-2N, VEGFR-3N) kontrol ile hipoksi grubunun karşılaştırılmasında; hipoksi grubu standart alındığındaki değerler (VEGFR-1H, VEGFR-2H, VEGFR-3H) ise hipoksi grubu ile deney grubunun karşılaştırılmasında kullanıldı.

Tablo V. Kontrol grubu standart alındığında VEGFR ekspresyon verileri

Değişkenler	VEGFR-1N	VEGFR-2N	VEGFR-3N	P değeri
Kontrol (n:10)	1.162±0.854	1.606±1.393	1.808 (0.178-3.655)	>0.05
Hipoksi (n:10)	0.994±0.582	0.266±0.216	0.208 (0.088-0.763)	>0.05

VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ekspresyonları açısından bakıldığında kontrol grubu ile hipoksi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.005$) (Tablo V) (Şekil 12).



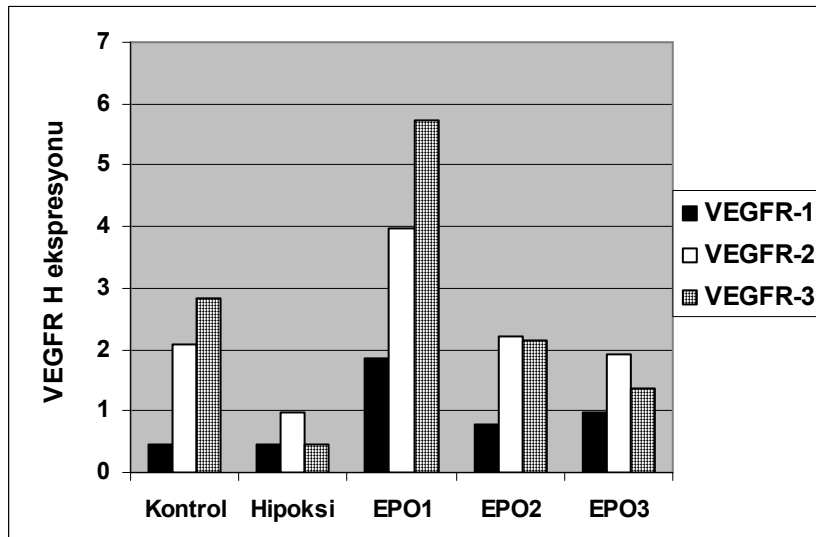
Şekil 12. VEGFR ekspresyonlarının kontrol ve hipoksi grubundaki değerleri

Hipoksi grubu ile deney grubu karşılaştırıldığında; VEGFR-1 değerleri açısından gruplar arasında fark yok iken EPO1 grubunun VEGFR-2 ve VEGFR-3 değerleri hipoksi grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$) (Tablo VI) (Şekil 13-15).

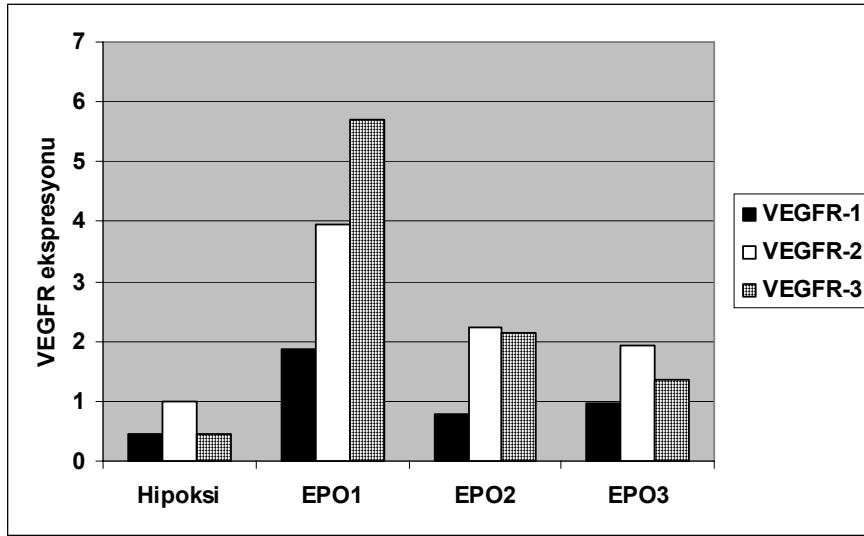
Tablo VI. Hipoksi grubu standart alındığında VEGFR ekspresyon verileri

değişkenler	Hipoksi (n:10)	Hipoksi+EPO grubu			P değeri
		EPO1 (n:10)	EPO2 (n:10)	EPO3 (n:9)	
VEGFR-1H	0.464 (0.076-1.942)	1.866 (0.134-4.840)	0.793 (0.105-3.030)	0.964 (0.086-1.884)	>0.05
VEGFR-2H	0.985±0.820	3.963±2.195 b	2.224±2.120	1.920±1.514	<0.05
VEGFR-3H	0.460 (0.076-3.544)	5.717 b (0.283-10.459)	2.154 (0.344-7.192)	1.363 (0.622-7.476)	<0.05

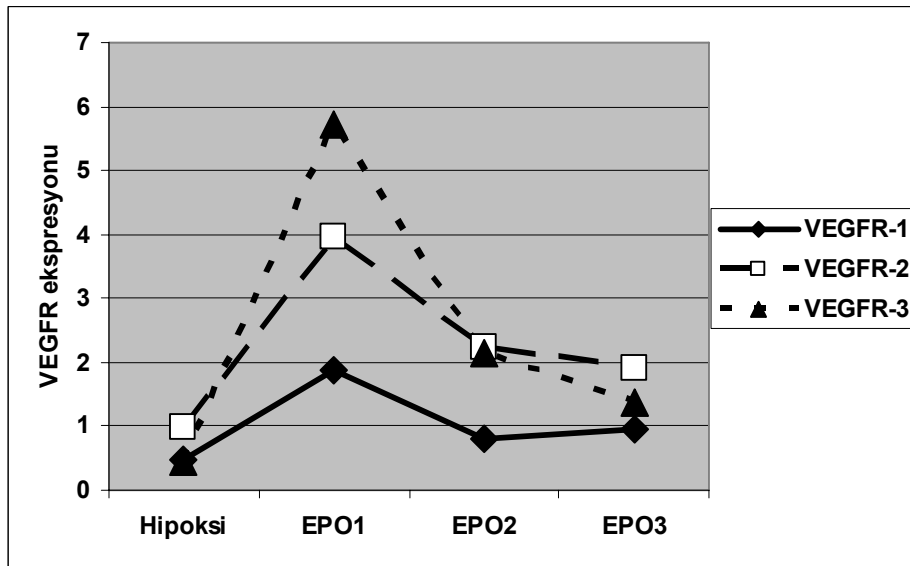
b p<0.005; hipoksi grubu ile kıyaslandığında



Şekil 13. VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri (Kontrol değerleri kontrol standart alındığındaki, Hipoksi ve EPO değerleri hipoksi standart alındığındaki değerlerdir).



Şekil 14. VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri



Şekil 15. VEGFR ekspresyonlarının hipoksi ve deney grubundaki değerleri

Tablo VII. VEGFR-3 ile ilişkili parametreler

Değişkenler	VEGFR-3 ekspresyonu (n=10)	
	r	P
VEGFR-1	0.63	0.01
Beyin skoru	0.28	0.04
Yolk sak dolaşımı	0.33	0.02
Ön ekstremitte	0.20	0.04

VEGFR-3 ekspresyonu ile VEGFR-1, beyin skoru, yolk sak dolaşımı ve ön ekstremitte arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki mevcuttu ($p < 0.05$, Tablo VII).

TARTIŞMA

Günümüze kadar hipoksinin perinatal ve geç dönem etkileri çok iyi bilinmesine rağmen, gestasyonun erken dönemindeki embriyonel etkileri daha az bilinmektedir. Hipoksi sonucu embriyonik gelişimde gecikme veya embriyo kaybı görülebilmektedir (93). Sıçan embriyo kültüründe 9,5-11,5 günlük organogenezis dönemi insan embriyosunda fertilizasyondan sonra 3-6. haftaya denk gelmektedir. *In vitro* sıçan embriyo kültürü tekniği in utero hipoksi dışında organogenezis döneminde fetüs gelişiminde etkili olan anjiogenezis ve nörogenezis mekanizmaların üzerinde çalışmak açısından da önem arz etmektedir (1,5,7).

In vitro embriyo kültür tekniği sayesinde embriyo gelişim süresinin belli dönemlerinde belirli teratojenlerin, embriyo gelişimi üzerine farklı zamanlardaki etkilerine bakılabilmektedir. Ayrıca embriyo kültürü ortamına konulacak maddelerin konsantrasyonları belirlenebilmekte ve annenin metabolizması ortadan kaldırılarak birçok maddenin embriyonik gelişim üzerindeki direkt etkileri çalışılabilmektedir (2).

Pek çok araştırmacı vaskülogenez ve anjiogenez, damar gelişiminde farklı iki yol olarak tanımlamışlardır. Bu olaylar erken embriyogenez ve postnatal dönemde meydana gelmektedir (75-77). Vaskülogenezde mezenşimal hücreler angioblastlara,

angioblastlar endotel hücrelerine, endotel hücreleri ise primer kan damarına dönüşür (75). Dolayısıyla vaskülogenez erken embriyogenez sırasında oluşur ve erişkinlerde meydana gelmez. Anjiogenez ise daha önceden var olan kan damarlarından yeni kapillerlerin meydana gelmesi anlamına gelir. Hem gelişen embriyo hem de postnatal hayatta gerçekleşir (75,77). *In vitro* embriyo kültür tekniği bu iki mekanizmanın anlaşılması için ideal bir yöntem haline gelmiştir (1,2).

Rosenzweig ve arkadaşları (2) hipoksinin gestasyonun erken döneminde embriyo kültürü üzerine etkisini araştırmışlardır. Organogenezis süresince hipoksiye çok kısa dönemde bile maruz kalmanın embriyonun büyüme ve gelişmesini bozabileceğini, hipoksinin hem büyüme hem de farklılaşma üzerinde etkisi olduğunu ve reoksijenlenme ile hipoksinin embriyo üzerindeki zarar verici etkilerinin arttığını ortaya çıkarmışlardır. Hipoksi-reoksijenizasyon periyoduna maruz kalan embriyoda belirgin bir şekilde nöral tüp ödemi ve beyin ventriküllerinde genişleme tespit edilmiştir. İlginç olarak, hipoksinin tek başına nöral tüp ödemi gelişmesine etkisi olmadığı gibi bu etkinin gelişmesi için reoksijenizasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda hipoksi grubu ve EPO3 grubunda kaudal nöral tüp gelişimi benzer iken EPO1 ve kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunması EPO'nun kaudal nöral tüp gelişimi üzerinde de etkili olduğunu düşündürmektedir. Ön çalışmada embriyolar sadece 2. gün hipoksiye (%20 yerine %5 O₂) maruz bırakılmış daha sonra gelişmeleri için gereken normal O₂ konsantrasyonu verilmiştir. Daha düşük konsantrasyonda gelişim olmadığı için bu dönem reoksijenizasyon periyodu olarak kabul edilmedi. Ayrıca hipoksinin kaudal nöral tüp gelişimi üzerine zararlı etkilerine karşılık EPO (200 Ü/ml) verilmesi ile arka nöropor oluşması sağlanmakta fakat nöral tüp kapanması gerçekleşmemektedir.

Johshita ve arkadaşları (94) iki saat gibi çok kısa bir sürede hipoksiye maruz kalan embriyoda somit sayısında önemli derecede bir azalma tespit etmişlerdir. Embriyo gelişimi sırasındaki hipoksinin embriyo büyümesinden ziyade farklılaşmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da hipoksi grubunda somit sayısı ve baş-kıç uzunluğunda belirgin bir azalma tespit edilmiş iken ortalama vitellus kesesi çapında farklılık olmaması hipoksinin büyümeden ziyade farklılaşmayı etkilediği tezini desteklemektedir.

EPO'nun keşfinden 60 yılı aşkın bir süreden sonra, bir dizi deneylerle EPO'nun beyinden üretilebileceğine dair kanıtlar bulunmuştur. İlk çalışmalarda, EPO'nun 19. gebelik haftasından itibaren üretildiği saptanmıştır. Ancak son yapılan çalışmalarda, gebeliğin daha erken dönemlerinde de EPO'nun beyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Juul ve arkadaşları (33), abortus nedeni ile fetusların beyinlerini incelemişler, 5-6 haftalıkken EPO ve EPO reseptörlerini periventriküler germinal zonda, 10 haftalık iken de kortikal duvar ve ventriküllerin etrafı boyunca bol miktarda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Embriyonel hayatta bu bölgede oligodendrosit ve astrositlerin geliştiği multipotent hücreler vardır.

Daha sonra çeşitli hayvan ve postmortem insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, beynin temporal, frontal ve oksipital korteksleri, serebellum, hipotalamus, kaudat çekirdekler dâhil olmak üzere incelenen bütün alanlarda hücresel seviyede EPO ve reseptörünün bulunduğu gösterilmiştir (34).

Miskowiak ve arkadaşları (95) yüksek doz sistemik olarak verilen EPO'nun bir hafta sonra bakıldığında normal erişkin memelilerde hipokampal nörojenезisi uyardığını ortaya çıkarmışlardır.

Chen ve arkadaşları (48) EPO-R olmayan farelerde ciddi anemi gelişmeden önce nöral öncül hücrelerde azlık, hipoksiye duyarlılıkta artış, nöron farklılaşmasında bozulma olduğunu ve takiben eritrosit üretimindeki eksiklik nedeniyle in utero 13,5 günden önce ölüm olduğunu bildirmişlerdir.

Buemi ve arkadaşları (39) nöron ve astrositlerin EPO salgılama yeteneği olduğunu ve beyinde özel EPO-R bulunduğunu göstermişlerdir. Bu yüzden bu hormonun beyin fonksiyonları üzerine parakrin etkileri olduğu düşünülmüştür. EPO reseptörleri beyin damarlarının endotel hücreleri üzerinde de tariflenmiştir. Fakat bu hormonun beyin ve böbrek arasındaki iletişimi henüz tam açıklığa kavuşturulmamıştır.

Matsuda ve arkadaşları (29) iki nöral kaynaklı hücre dizisinde EPO reseptörünü göstermişlerdir. *In vitro* olarak astrositlerin EPO ürettiğini ve hipoksi ile mRNA ekspresyonunda artış olduğunu da ortaya çıkarmışlardır. EPO ve EPO-R mRNA'sının temporal korteks, hipokampus, serebellum ve amigdale'de hipoksi sonrası artmış olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçta, gelişen beyinde EPO ve EPO-R varlığı SSS hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması için bu hormonların önemini göstermektedir. *In vitro* olarak hipoksi, *in vivo* ise anemi EPO ve EPO-R ekspresyonunu uyarmakta ve hassasiyetlerini arttırmaktadır.

Çalışmamızda EPO verilmesi ile embriyo gelişiminde oluşan iyileşmede hipoksinin EPO ve EPO-R hassasiyetini arttırmasının da etkili olduğu düşünülmektedir.

EPO'nun, serebral iskemi sırasında beyindeki etkisini ve önemini gösteren birçok çalışma yapılmıştır.

Wen ve arkadaşları (59) 20 sıçan yavrusunda hipoksi sonrası ve anti-tavşan EPO reseptör antikoları ile Western Blot analiz yöntemini kullanarak iskemi bölgesinde EPO reseptörünün 6. saatten sonra önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. EPO'nun apoptotik hücre ölümünü etkilediğini bildirmişlerdir. Spandou ve arkadaşları (27) 7 sıçan yavrusunun tek taraflı karotid arterlerini bağlayarak, beyinlerini bir saat kadar hipoksida bırakmışlardır. Hipokside 24 saat ile 4 gün sonra beyinlerini incelediklerinde kortikal infarkt ve bazı alanlarda nöron kaybıyla karşılaşmışlardır. Bu hasarlı serebral korteks sınırlarında ve astrositlerde immünohistokimyasal olarak EPO artışını tespit etmişler ve çalışmalarında, hipoksik iskemik uyarı ile EPO ve EPO reseptör sisteminin aktifleşerek nöronları korumaya çalıştığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca ikinci bir çalışmada ise perinatal asfiksi oluşturulmuş deneysel hayvan modelinde EPO'nun hipoksinin uyardığı DNA fragmantasyonunu önleyerek de koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (55).

Castillo-Melendez ve arkadaşları (96) gebe koyunları, umbilikal kordonlarını 10 dakika kadar klempe ederek hipoksida bırakmışlar ve 48 saat sonra beyinlerini incelemişler. İmmünohistokimyasal olarak çalıştıkları preparatlarında asfiktik koyunların beyinlerinde, sağlıklı doğan koyunların beyin dokularına göre, en fazla korteks ile ventrikül çevresinde EPO ve EPO reseptör artışıyla karşılaşmışlardır. Umbilikal kord iki defa 10' ar dakikalık klempe edildiğinde ise beyin incelenen tüm alanlarında EPO artışını tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında, hipoksik beyinlerde yaygın lipid peroksidasyonu ve apoptoz artışı görülmesi üzerine beyin adaptasyon mekanizması olarak EPO'nun ekspresyonunu arttırdığı ve böylece nöronal hücreleri koruduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yu ve arkadaşları (38) EPO genini delesyona uğrattıkları farelerin beyin gelişimlerini incelediklerinde, EPO reseptörleri yetersiz olan 4. ventrikül bölgesinde hipoplazi ile beraber yüksek bir apoptoz hızının olduğunu ortaya çıkarmışlardır.

Bernaudin ve arkadaşları (97) sol orta serebral arter kalıcı tıkanıklığında farelerde fokal beyin iskemisinin önlenmesinde EPO'nun rolünü araştırmışlardır. İntraventriküler rHuEPO enjeksiyonu ile farelerde infarkt volümünde önemli bir azalma sağlanmıştır. Bu çalışma üzerine sistematik olarak verilen rHuEPO'nun kan

beyin bariyerini geçip geçemeyeceği yönünde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Brines ve arkadaşları (35) EPO'nun kan beyin bariyerini geçebileceğini yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir.

Son yapılan çalışmalarda (41) EPO tedavisi ile inme sonrası 6. saatte bile doku zedelenmesinin önemli oranda azaldığı ortaya çıkmıştır.

Sun ve arkadaşları (50) yenidoğan sıçanlarda hipoksi iskemi modeli oluşturmuşlar ve hipoksik-iskemik gruba EPO tedavisi vermişlerdir. rHuEPO'nun beyin zedelenmesini özellikle apoptotik hücre ölümünü azaltarak ve Heat Çok protein (HSP27) aktivasyonu aracılığı ile sağladığını ortaya çıkarmışlardır.

Takiben subaraknoid kanamada EPO etkinliği araştırılmıştır. Springborg ve arkadaşları (98) deneysel SAK modelinde mikrodolaşımsal bozuklukları göstermişlerdir. Buemi ve arkadaşları ise deneysel SAK modelinden hemen sonra uygulanan rHuEPO'nun mortalite hızını azalttığı ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını ortaya çıkarmışlardır.

Stockmann ve arkadaşları (32) böbrek ve karaciğerde hipoksi ile oluşan EPO ekspresyonunun geçici olduğunu beyindeki EPO mRNA seviyesinin ise hipoksik uyarı süresince devam ettiğini belirtmişlerdir. EPO'nun salınımı ve etkisini hipoksi ile değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

İnsanlarda hipoksi ile EPO arasındaki ilişkiyi incelemek için Fahnenstich ve arkadaşları (99), 75 tane akut ve kronik stresde kalmış matür bebekten, 77 tane prematüre bebekten ve 54 tane sağlıklı matür bebekten alınan kan örneklerinden EPO düzeyleri çalışmışlar. Stresle EPO düzeylerinin arttığını, özellikle bu yksekliliğin, akut streste daha belirgin olduğunu belirtmişlerdir.

İleriki yıllarda, sadece hipoksinin değil hipoglisemi, nöronal depolarizasyon, mitokondrial reaktif oksijen radikallerinin de HIF aktivasyonu yaparak beyin EPO üretimini yaptığı bulunmuştur. EPO reseptörlerine bağlanarak endositozis yoluyla beyinde koruyucu etki göstermektedir.

Lewczuk ve arkadaşları (30) hipoksinin başlangıcında yenidoğan sıçanların hipokampal nöron kültürlerinin EPO ile tedavisi sonucu nöronal ölümün nlendiğini tespit etmişlerdir. İlginç olarak, erişkin sıçan beyinde normal Şartlarda EPO mRNA ve EPO-R mRNA ekspresyonu yok iken hipoksi sonucu hızla artmıştır.

Çalışmamızda 11,5 günlük sıçan embriyosunda uygun dozda verilen EPO hipoksi grubuna göre total morfolojik skor, somit sayısı ve beyin skorunda belirgin bir iyileşme sağlamıştır.

EPO endotel hücrelerini indirekt olarak VEGF/VEGFR sisteminin aktivasyonu ile etkilemektedir (100).

Sığır aortik ve glomerüler endotel hücrelerinin EPO ile uyarılması sonucu oluşan endotel hücre çoğalması spesifik anti-VEGF antikoru ile önlenebilir (101). Ayrıca EPO tedavisi sonrası aortik hücrelerde VEGFR1 ve VEGFR2 mRNA ekspresyonu artmaktadır. Sonuç olarak, glomerüler endotel hücrelerinin EPO ile inkübasyonu anti-EPO antikoru ile ortadan kaldırılabilen doz bağımlı VEGF salınımına neden olur. Bu sonuçların fizyolojik önemi halen açığa çıkarılamamıştır. Fakat en azından *in vivo* olarak endotel hücrelerinin önemli miktarda VEGF üretmediği görülmektedir. Beyinde EPO ve VEGF arasındaki etkileşim halen tartışmalıdır. Valable ve arkadaşları (102) VEGF artışının KBB geçirgenliği ve beyin ödemi arttırdığını söylemişlerdir. Martinez-Estrada ve arkadaşları (36) EPO'nun VEGF aracılığı ile olan KBB bozukluğunu *in vitro* olarak önlediğini bildirmişlerdir.

Matchett ve arkadaşları (57) EPO'nun cerrahi beyin zedelenmesinde etkisiz olduğu hatta VEGF düzeyini arttırarak beyin ödemi ortaya çıkardığını bildirmişlerdir. İmmunflorasan teknik ile hipoksi sonrası hem EPO ile tedavi edilen hem de edilmeyenlerde beyinde tedavi edilenlerde çok daha yüksek düzeyde olmak üzere VEGF ekspresyonu tespit etmişlerdir. VEGF üretiminin EPO reseptör ekspresyonu ile doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca, hipoksi ile veya VEGF ile uyarılması sonucunda VEGF-R2 mRNA ve protein seviyesi belirgin bir şekilde artarken Plate ve arkadaşları beyin kültüründe EPO tedavisinin VEGF-R2 ekspresyonuna etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda farklı olarak EPO ile VEGFR2 ve VEGFR3 artışı görülmüş olup EPO'nun nöron koruyucu etkisini VEGF üzerinden yaptığını düşündürmüştür.

Sköld ve arkadaşları (103) deneysel sıçan beyin kontüzyonu modelinde VEGF ve reseptörlerini çalışmışlardır. Lezyon bölgesinde Flt-1 ve Flk-1 mRNA ve proteinlerinde artış tespit etmişlerdir. Vasküler permeabilite değişikliklerinde Flk-1 en önemli reseptör olduğu, iskemik SSS zedelenmelerinde VEGF'in anjiogenezi uyardığı ve posttravmatik beyin ödemi oluşumunu arttırarak inflamatuvar cevap oluşturduğunu belirtmişlerdir. Lezyon bölgesinde maksimum VEGF ekspresyonu yaklaşık 4.gün civarında bulunmuştur. Hayvan çalışmalarında hipoksi sonrası 3 saat kadar erken bir sürede VEGF ekspresyonunda artış olduğunu ve 48 saat kadar sürdüğü, Zhu ve arkadaşlarının çarşılmasında ise iskemi sonrası 1.günde HIF-1 ekspresyonu ve 7. günde ise VEGF ekspresyonunda artış olduğunu bildirilmiştir.

Çalışmamızda embriyo kültüründe hipoksiden 1 gün sonra VEGFR ekspresyonunda artma tespit edilmiştir.

Wang ve arkadaşları (85) farelerin orta serebral arterlerini bağlayıp hipoksidede bıraktıktan 24 saat sonra 5000 Ü/ kg' dan 7 gün boyunca her gün EPO'yu sistemik olarak uygulamışlardır. Yedinci günün sonunda BDNF ve VEGF düzeyleri için serum örneği almışlar ve beyinlerini incelemişlerdir. EPO alan hipoksik sıçanların VEGF ile BDNF düzeylerinin, almayan hipoksik sıçanlara göre belirgin yüksek, infarkt alanının da daha küçük olduğunu ve infarkt sınırlarındaki hücrelerinde ise çoğalma eğiliminde olduğunu tespit etmişlerdir. rHuEPO tedavisi beyin VEGF düzeyini arttırması ve EPO'nun uyardığı kapiller benzeri tüp oluşumunu VEGF-R2 antagonisti (SU1498) ile bloke edilmesi VEGF'in EPO'nun sağladığı anjiogenezise aracılık ettiğini göstermektedir. Çalışmalarında EPO'nun VEGF ile BDNF' yi arttırarak, nöronların çoğalmasını ve kapiller oluşumları desteklediğini, böylece nöronları koruma fonksiyonu yanında inme sonrası iyileşmede, çevre dokuların düzenlenmesinde katkıda bulunduğunu saptamışlardır.

Hai ve arkadaşları (104) sıçan beyinde kronik beyin hipoperfüzyonun VEGF mRNA'sında ve protein ekspresyonunda artış sağladığını bunun da anjiogenezis ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Maurer ve arkadaşları (105) sıçan nöral kök hücre kültüründe normal oksijen olduğunda VEGF-R2 ekspresyonunu hipokampus, subventriküler zon ve olfaktör hücrelerinde tespit etmişlerdir. Fakat VEGF-R1 ve VEGF-R3 sinyali görmemişlerdir. VEGF-R2 mRNA ekspresyonu hipoksik şartlarda subventriküler ve olfaktor bölgede gözükmez iken hipokampal nöral kök hücrede devam etmiştir. VEGFR-3 mRNA hipokampus nöral kök hücrelerinde hipoksi ile uyarılmıştır. Son çalışmalarla VEGF ekspresyonunun erişkin nöral kök hücrelerinde görülmemesine rağmen hematopoietik kök hücrelerde görülmesi üzerine VEGF ve reseptör ekspresyonu üzerine "internal otokrin loop mekanizması" adı altında bir mekanizma öne sürülmüştür (105). Bu mekanizmaya göre tüm nöral kök hücrelerde görülen VEGF mRNA ekspresyonu ne anoksi ne de dışardan verilen VEGF ile baskılanmaktadır. Bu da beyinden kaynaklı kök hücrelerde VEGF uyarısının intrinsek olduğu görüşünü öne çıkarmaktadır.

İlginç olarak, en yüksek VEGF mRNA ekspresyonu *in vivo* spontan nörogenesis olduğu yerlerde bulunmuştur. Nöral kök hücrelerde VEGF ekspresyonu olması bu hücrelerin endotel öncüllerinin uyarılması veya doğrudan anjiogenik etkiler ile yeni

damarlanma ve anjiogenezise katkıları olduğunu göstermektedir. Son yıllarda VEGF R2'nin fare embriyo kortikal hücre kültüründe eksprese olduğu ve dışardan VEGF verilmesi ile *in vivo* olarak beyinde VEGF-R2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (82).

Maurer ve arkadaşları (105) çalışmalarında nöral kök hücrelerinde VEGF-R2'nin önemli olduğunu göstermişlerdir. VEGF-R2 başlıca hücre proliferasyonu ve sağkalımından sorumlu tutulmuştur. Daha önceki çalışmalarda VEGF-R3'ün lenfanjiogenezisde önemli olduğu gösterilmişken bu çalışmada anoksiye bağlı hipokampal hücrelerde artmasının VEGF-R3'ün henüz bilinmeyen bir fonksiyonunu da ortaya çıkarmıştır.

Çalışmamızda kontrol grubunda VEGFR-1,-2 ve -3 tespit edilmiş olup hipoksizde ekspresyonlarında azalma, uygun dozda EPO verildiğinde ise özellikle VEGFR-2 ve -3 mRNA düzeyinde belirgin bir artış görülmüştür. VEGFR-1 artışı diğerleri kadar belirgin değildir.

Ogunshola ve arkadaşları (107) *in vivo* ve *in vitro* olarak 15 günlük embriyo kortikal nöronlarında VEGF ve reseptörü olan Flk-1 ekspresyonunu tespit etmişlerdir.

Bellomo ve arkadaşları (92) VEGF165'in gelinciklerin korteksinde ve hipokampal pirimidial tabakada EPO ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. VEGF165'nin EPO üretimi için hipoksik sinyal olarak rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. VEGF özellikle beyin hipoksisini takiben görülen anjiogeneziste primer rol oynayan bir faktördür. Günler veya haftalarla devam eden orta serebral arter tıkanmalarında da VEGF ekspresyonu birkaç saat içinde artmaktadır.

İskemik inme sonrası beyin dokusunda nöronlar, astrositler ve endotel hücrelerinde VEGF mRNA sentezi artarken kan damarlarında VEGF reseptör ekspresyonu artmaktadır (103). Beyin iskemisinde önce HIF-1 α takiben VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonu artmaktadır. VEGF ekspresyonu hipoksizde HIF-1 α aracılığı ile artar. HIF-1 α anjiogenezisde gerekli olan transkripsiyon (plazmojen aktivatör inhibitör, VEGF, endotelin-1, indüklenen NO sentez ve insülin-benzeri büyüme faktörü) genlerini aktifleştirmektedir (108).

Çalışmamızda hipoksi ile VEGFR ekspresyonları azalmaktadır. VEGF endojen savunma sistemine yer aldığı için *in vitro* embriyo kültür ortamında yeteri kadar salınmadığı, hipoksi şiddetinin VEGFR üretim düzeyinin çok üzerinde olduğu, HIF-1 α 'nın etkili olamadığı veya nörogenezis sırasında çok yoğun olan VEGFR ekspresyonunun göreceli olarak azalmış olabileceği akla gelmektedir.

İlginç olarak, hem VEGF'in hem de EPO'nun *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda nöron koruyucu olarak rol oynadığı gösterilmiştir. EPO ile VEGF ilişkisinde primer sorumlu olarak HIF-1 α tarafından düzenlenen oksijen-sensör yolağının olduğu düşünülmeye rağmen SSS'de EPO ile VEGF ilişkisi tam olarak ortaya çıkarılamamıştır.

Kim ve arkadaşları (109) embriyonik 13. günde lateral ventrikülün ventriküler bölgesinde daha çok olmak üzere VEGF reseptörleri olan Flt-1 ve Flk-1 mRNA'sı tespit etmişlerdir. Bu ekspresyon 15. günde kortikal bölgede iken 20. günde kortikal bölgenin derin kısımlarında, daha zayıf ve sınırlı olarak görülmüştür. Neticede sıçan ön beyin gelişiminde spesifik VEGF reseptörleri yoluyla nöronların çoğalması, farklılaşması ve olgunlaşması sağlanmaktadır.

Nöral kök hücre kültürü ve fare embriyonik kortikal nöronlar VEGF ve reseptörlerini eksprese etmektedir. VEGF'nin *in vitro* nörogenezisi uyarması Flk-1 reseptörü aracılığı ile olmaktadır (110).

VEGF'ün gelişim sürecince rolünü gösteren birçok çalışma olmasına rağmen gelişen beyindeki VEGF reseptör ekspresyonunu gösteren çok az çalışma vardır. Bu yüzden çalışmamız beyin gelişiminin erken döneminde VEGFR gösterilmesi bakımından anlamlıdır.

Yang ve arkadaşları (111) yenidoğan ve erişkin sıçan beyinde kortikal ve hipokampal nöronlarda Flk-1 ve Flt-1 ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Flk-1'in hem yenidoğan hem de erişkin nöron gelişiminde önemli olduğu Flt-1'in ise immatür beyin gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Flk-1 ve Flt-1 beyin damarlarında yüksek oranda tespit edilmiştir. Beyin gelişiminde damar oluşumu ve dağılımı çok önemli olduğu için bu durum VEGF'in beyin anjiogenezisindeki önemini de göstermektedir. Erişkin sıçan beyninin subgranüler zonunda nörogenezis yüksek VEGF içeren anjiogenik bölgeden başlamaktadır. Bu bulguda beyinde nörogenezis ve anjiogenezisin VEGF ve VEGFR'nin fizyolojik fonksiyonları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Flt-1 ve Flk-1'in hem ventriküler ve subventriküler zondaki kök hücrelerin çoğalmasında hem de embriyonik korteks ve hipokampusda postmitotik differansiasyonda eksprese edildikleri görülmektedir. VEGF, gelişmekte olan sıçan beyinde çoğalma, farklılaşma ve olgunlaşmayı içeren gelişim basamaklarını reseptörü yolu ile sağlamaktadır.

Schanzer ve arkadaşları (112) *in vivo* olarak VEGF'nin ventrikül duvarı, olfaktör bölge ve hipokampustaki nörogenezis üzerine etkilerinin göstermek için

intraventricüler yoldan VEGF uygulamışlardır. Düşük doz VEGF'in endotel hücre çoğalması yapmadan vasküler geçirgenlikte değişiklik yaparak nörogenezisi uyardığını tespit etmişlerdir. Koroid pleksusa komşu ventrikül duvarında da güçlü Flk-1 ekspresyonu tespit edilmesi *in vivo* olarak nöral kök hücre üzerine endojen VEGF'in parakrin fonksiyon gösterdiğini düşündürmektedir.

Ding ve arkadaşları (113) sıçan embriyonik spinal kord nöron kültürüne hipoksi sonrası VEGF uygulamışlardır. Hipoksinin nöron sayısı ve canlılığını azalttığını fakat VEGF uygulaması ile apoptozisin azaldığını tespit etmişlerdir. VEGF direkt nöron koruyucu etkisini Flk-1 reseptörü üzerinden gerçekleştirmiştir. Li ve arkadaşları (37) farelerde fokal beyin iskemisi ile oluşan KBB zedelenmesini EPO'nun koruduğunu öne sürmüşlerdir. Artmış VEGF seviyesine rağmen rHuEPO KBB'de iskemiyeye bağlı olan zedelenmeye karşı kısmen flk-1 ekspresyonunda azalma sağlayarak koruyuculuk yaptığını belirtmişlerdir. İskemi sonrası oluşan NO ve artan VEGF KBB devamlılığını ödem ve sekonder zedelenmeye sebep olarak bozmaktadır. *In vivo* çalışmalarda orta serebral arter tıkanıklığında VEGF sinyalinin anti-VEGF antikoları bloke edilmesi KBB bozukluklarına karşı koruma sağlamaktadır. Çalışmalarında VEGF ekspresyonu artsa bile Flk-1 ekspresyonunun azalması ile KBB devamlılığının sağlandığını fakat bu konuda ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda hipoksi sonrası EPO verilmesi ile VEGFR-2 ve -3 seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Bu artış ile birlikte embriyo gelişiminde de iyileşme sağlanırken vitellus kesesinde ödem ve zedelenme saptanmamıştır.

Sonuç olarak, beynin endojen koruyucu mekanizmalarını taklit etmek başarılı bir nöron koruyucu tedavi için anahtar rol oynamaktadır. VEGF'in anjiogenezisde olduğu kadar nörogenezisde de etkili olduğu ve EPO ile karşılıklı etki göstererek vücudun endojen bir savunma sistemi olarak görev yaptığını düşünmekteyiz. Fakat VEGF/VEGFR sisteminin EPO aracılığı ile anjiogenezis ve nörogenezis üzerine olan etkisini tam olarak ortaya çıkarmak için daha fazla çalışmaya gerek vardır.

SONUÇLAR

- ✓ Vaskülogenezis, anjiogenezis ve nörogenezis mekanizmalarının öğrenilmesi için *in vitro* embriyo kültür tekniği ideal bir yöntemdir.
- ✓ Organogenezis süresince hipoksiye çok kısa dönemde bile maruz kalmanın embriyonun büyüme ve gelişmesini bozabileceğini, hipoksinin hem büyüme hem de farklılaşma üzerinde etkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır.
- ✓ Hipoksi grubu ve EPO3 grubunda kaudal nöral tüp gelişimi benzer iken EPO1 ve kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulunması EPO'nun kaudal nöral tüp gelişimi üzerinde de etkili olduğunu düşündürmüştür. Ön çalışmada embriyolar sadece 2. gün hipoksiye (%20 yerine %5 O₂) maruz bırakılmış daha sonra gelişmeleri için gereken normal O₂ konsantrasyonu verilmiştir. Daha düşük konsantrasyonda gelişim olmadığı için bu dönem reoksijenizasyon periyodu olarak kabul edilmemektedir. Ayrıca hipoksinin kaudal nöral tüp gelişimi üzerine zararlı etkilerine karşılık EPO (200 Ü/ml) verilmesi ile arka nöropor oluşması sağlanmakta fakat nöral tüp kapanması gerçekleşmemektedir.
- ✓ Hipoksi grubunda somit sayısı ve baş-kıç uzunluğunda belirgin bir azalma tespit edilmiş iken ortalama vitellus kesesi çapında farklılık olmaması hipoksinin büyümeden ziyade farklılaşmayı etkilediği tezini desteklemektedir.
- ✓ EPO verilmesi ile embriyo gelişiminde oluşan iyileşmede hipoksinin EPO ve EPO-R hassasiyetini arttırmasının da etkili olduğu düşünülmektedir.
- ✓ Sıçan embriyosu 11,5 günlük iken değerlendirildiğinde uygun dozda verilen EPO'nun hipoksi grubuna göre total morfolojik skor, somit sayısı ve beyin skorunda belirgin bir iyileşme sağladığı tespit edilmiştir.
- ✓ Çalışmamızda embriyo kültüründe hipokside 1 gün sonra bile VEGFR ekspresyonunda artma tespit edilmiştir.
- ✓ Kontrol grubunda VEGFR-1,-2 ve -3 tespit edilmiş olup hipokside ekspresyonlarında azalma, uygun dozda EPO verildiğinde ise özellikle

VEGFR-2 ve -3 mRNA düzeyinde belirgin bir artış görülmüştür. VEGFR-1 artışı diğerleri kadar belirgin değildir. VEGFR-3 kontrol ve deney grubun da tespiti daha önceki çalışmalarda sadece lenfanjiogenezisde rol oynadığı tezini çürütmektedir. Embriyonik dönemde hem embriyo ve beyin gelişiminde hem de anjiogenezisde her üç reseptörde rol oynamaktadır.

- ✓ Hipoksi ile VEGFR ekspresyonları azalmaktadır. VEGF endojen savunma sistemine yer aldığı için *in vitro* embriyo kültür ortamında yeteri kadar salınmadığı, hipoksi şiddetinin VEGFR üretim düzeyinin çok üzerinde olduğu, HIF-1 α 'nın etkili olmadığı veya nörogenezis sırasında çok yoğun olan VEGFR ekspresyonunun göreceli olarak azalmış olabileceği akla gelmektedir.
- ✓ Hipoksi sonrası EPO verilmesi ile VEGFR-2 ve -3 seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Bu artış ile birlikte embriyo gelişiminde de iyileşme sağlanırken vitellus kesesinde ödem ve zedelenme saptanmamıştır.
- ✓ Beynin endojen koruyucu mekanizmalarını taklit etmek başarılı bir nöron koruyucu tedavi için anahtar rol oynamaktadır. VEGF'in anjiogenezisde olduğu kadar nörogenezisde de etkili olduğu ve özellikle hipokside EPO ile karşılıklı etki göstererek vücudun endojen bir savunma sistemi olarak görev yaptığını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. New DA. Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1978;53:81-122.
2. Rosenzweig I. Detrimental effects of hypoxia-reoxygenation injury on development of rat embryos during organogenesis in vitro. *Croat Med J* 2003;44:157-60.
3. Nakagawa M, Price RL, Chintanawonges C, et al. Analysis of heart development in cultured rat embryos. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:369-79.
4. Liu JN, Chan HM, Kubow S. Oxidative stress status and development of late organogenesis stage rat whole embryos cultured from gestational days 13.5 to 14.5. *Toxicol In Vitro* 2007;21:53-62.
5. Webster WS, Brown-Woodman PD, Ritchie HE. A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. *Int J Dev Biol* 1997;41:329-35.
6. Miura S, Mishina Y. Whole-embryo culture of E5.5 mouse embryos: development to the gastrulation stage. *Genesis* 2003;37:38-43.
7. Klein NW. The use of whole rat embryo cultures to identify and characterize causes of reproductive failure. *Int J Dev Biol* 1997;41:267-73.
8. Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured rat embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007;80:383-95.
9. Calciu C, Kubow S, Chan HM. Interactive dysmorphogenic effects of toxaphene or toxaphene congeners and hyperglycemia on cultured whole rat embryos during organogenesis. *Toxicology* 2002;175:153-65.
10. Chan LY, Chiu PY, Lau TK. An in-vitro study of ginsenoside Rb1-induced teratogenicity using a whole rat embryo culture model. *Hum Reprod* 2003;18:2166-8.
11. Danielsson BR, Azarbayjani F, Sköld AC, Webster WS. Initiation of phenytoin teratogenesis: pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology* 1997;56:271-81.

12. Chan LY, Chiu PY, Siu SS, Lau TK. A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. *Hum Reprod* 2001;16:2390-3.
13. Longo M, Zanoncelli S, Manera D, et al. Effects of the antimalarial drug dihydroartemisinin (DHA) on rat embryos in vitro. *Reprod Toxicol* 2006;21:83-93.
14. Karabulut AK, Ulger H, Pratten M. Teratogenicity of edoferon kappa A, a molecule derived from salicylate, in cultured rat embryos: differences from salicylate and interaction with free oxygen radical scavenging enzymes. *Anat Histol Embryol* 2000;29:363-70.
15. Sameshima K, Kobae H, Fofana D, Yoshidome K, Nishi J, Miyata K. Effects of pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cultured rat embryos. *Congenit Anom* 2004;44:93-6.
16. Hewitt MJ, Mutch P, Pratten MK. Potential teratogenic effects of benomyl in rat embryos cultured in vitro. *Reprod Toxicol* 2005;20:271-80.
17. Bohn AA, Forsyth CS, Stoner GD, Reed DJ, Frank AA. Effect of cocaine, 95% oxygen and ellagic acid on the development and antioxidant status of cultured rat embryos. *Toxicol Lett* 1998;95:15-21.
18. Van Maele-Fabry G, Picard JJ, Attenon P, et al. Interlaboratory evaluation of three culture media for postimplantation rodent embryos. *Reprod Toxicol* 1991;5:417-26.
19. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007;78:183-205.
20. McMullin MF, Percy MJ. Erythropoietin receptor and hematological disease. *Am J Hematol* 1999;60:55-60.
21. McPherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int J Dev Neurosci* 2008;26:103-11.
22. Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R, Jia Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;64:159-71.
23. Buemi M, Caccamo C, Nostro L, Cavallaro E, Floccari F, Grasso G. Brain and cancer: the protective role of erythropoietin. *Med Res Rev* 2005;25:245-59.
24. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:577-83.

25. Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004;207:3233-42.
26. Mu D, Chang YS, Vexler ZS, Ferriero DM. Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol* 2005;195:407-15.
27. Spandou E, Papoutsopoulou S, Soubasi V, et al. Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res* 2004;1021:167-72.
28. Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx* 2004;1:26-35.
29. Matsuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994;269:19488-93.
30. Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, et al. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 2000;11:3485-8.
31. Li D, Marks JD, Schumacker PT, Young RM, Brorson JR. Physiological hypoxia promotes survival of cultured cortical neurons. *Eur J Neurosci* 2005;22:1319-26.
32. Stockmann C, Fandrey J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:968-79.
33. Juul S. Recombinant erythropoietin as a neuroprotective treatment: in vitro and in vivo models. *Clin Perinatol* 2004;31:129-42.
34. Dame C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, Fandrey J. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;125:69-74.
35. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:10526-31.
36. Martínez-Estrada OM, Rodríguez-Millán E, González-De Vicente E, Reina M, Vilaró S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci* 2003;18:2538-44.

37. Li Y, Lu ZY, Ogle M, Wei L. Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice. *Neurochem Res* 2007;32:2132-41.
38. Yu X, Lin CS, Costantini F, Noguchi CT. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse. *Blood* 2001;98:475-7.
39. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, et al. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci* 2002;103:275-82.
40. Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatr Res* 2005;58:297-301.
41. Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Cerami C, Itri LM. Neuroprotective properties of epoetin alfa. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:8-12.
42. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, et al. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:195-206.
43. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91:36-42.
44. Bühner C, Felderhoff-Mueser U, Wellmann S. Erythropoietin and ischemic conditioning--why two good things may be bad. *Acta Paediatr* 2007;96:787-9.
45. Lewis LD. Preclinical and clinical studies: a preview of potential future applications of erythropoietic agents. *Semin Hematol* 2004;41:17-25.
46. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004;35:1732-7.
47. Zhao D, Zhu BL, Ishikawa T, Quan L, Li DR, Maeda H. Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Leg Med* 2006;8:132-6.
48. Chen ZY, Asavaritikrai P, Prchal JT, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* 2007;282:25875-83.

49. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:990-4.
50. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672-8.
51. Sun Y, Zhou C, Polk P, Nanda A, Zhang JH. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:259-70.
52. Mikati MA, El Hokayem JA, El Sabban ME. Effects of a single dose of erythropoietin on subsequent seizure susceptibility in rats exposed to acute hypoxia at P10. *Epilepsia*. 2007;48:175-81.
53. Montero M, Poulsen FR, Noraberg J, et al. Comparison of neuroprotective effects of erythropoietin (EPO) and carbamylerythropoietin (CEPO) against ischemia-like oxygen-glucose deprivation (OGD) and NMDA excitotoxicity in mouse hippocampal slice cultures. *Exp Neurol* 2007;204:106-17.
54. Chang YS, Mu D, Wendland M, et al. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatr Res* 2005;58:106-11.
55. Spandou E, Papadopoulou Z, Soubasi V, et al. Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Res*. 2005;1045:22-30.
56. Chung YH, Kim SI, Joo KM, et al. Age-related changes in erythropoietin immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Res* 2004;1018:141-6.
57. Matchett G, Hahn J, Obenaus A, Zhang J. Surgically induced brain injury in rats: the effect of erythropoietin. *J Neurosci Methods* 2006;158:234-41.
58. Romsis P, Rönkä E, Kiviluoma K, et al. Potential neuroprotective benefits of erythropoietin during experimental hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:714-23.
59. Wen TC, Rogido M, Genetta T, Sola A. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett* 2004;355:165-8.

60. McPherson RJ, Demers EJ, Juul SE. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology* 2007;91:36-43.
61. Adembri C, Massagrande A, Tani A, et al. Carbamylated erythropoietin derivative is neuroprotective in an experimental model of traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 2008 Jan 2 [Epub ahead of print].
62. McClure MM, Threlkeld SW, Fitch RH. Auditory processing and learning/memory following erythropoietin administration in neonatally hypoxic-ischemic injured rats. *Brain Res* 2007;1132:203-9.
63. Kellert BA, McPherson RJ, Juul SE. A comparison of high-dose recombinant erythropoietin treatment regimens in brain-injured neonatal rats. *Pediatr Res* 2007;61:451-5.
64. Oztürk E, Demirbilek S, Köroğlu A, ve ark. Propofol and erythropoietin antioxidant properties in rat brain injured tissue. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:81-6.
65. Wang X, Zhu C, Wang X, et al. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem* 2004;91:900-10.
66. Liao ZB, Zhi XG, Shi QH, He ZH. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurol* 2008;15:140-9.
67. Kumral A, Uysal N, Tugyan K, ve ark. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behav Brain Res* 2004;153:77-86.
68. García-García F, Krueger JM. Intracerebroventricular injection of erythropoietin enhances sleep in the rat. *Brain Res Bull* 2003;61:541-6.
69. Masuda S, Moon SK, Kambe T, Nagao M, Sasaki R. A new biological strategy for high productivity of recombinant proteins in animal cells by the use of hypoxia-response enhancer. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:157-64.
70. Gonzalez FF, McQuillen P, Mu D, et al. Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* 2007;29:321-30.

71. Aydin A, Genç K, Akhisaroglu M, Yorukoglu K, Gokmen N, Gonullu E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev* 2003;25:494-8.
72. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:259-70.
73. Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O, Levi BZ. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* 1998;17:227-36.
74. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal* 2007;19:2003-12.
75. Marmé D. Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* 1996;14:166-74.
76. Yeh J, Kim BS, Peresie J. Ovarian vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor patterns in reproductive aging. *Fertil Steril* 2007 Sep 21 [Epub ahead of print].
77. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP. Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 2008;214:537-44.
78. Ebisch IM, Thomas CM, Wetzels AM, Willemsen WN, Sweep FC, Steegers-Theunissen RP. Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril* 2008 Feb 2 [Epub ahead of print].
79. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 2008 Feb 22 [Epub ahead of print].
80. Yasuhara T, Shingo T, Date I. The potential role of vascular endothelial growth factor in the central nervous system. *Rev Neurosci* 2004;15:293-307.
81. Zhu Y, Lawton MT, Du R, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor in response to venous hypertension. *Neurosurgery* 2006;59:687-96.

82. Joško J. Cerebral angiogenesis and expression of VEGF after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. *Brain Res* 2003;981:58-69.
83. Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, et al. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury. *Neuroscience* 2003;120:951-60.
84. Nag S, Eskandarian MR, Davis J, Eubanks JH. Differential expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-B after brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:778-88.
85. Wang YQ, Guo X, Qiu MH, Feng XY, Sun FY. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res* 2007;85:73-82.
86. Nicoletti JN, Shah SK, McCloskey DP, et al. Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus. *Neuroscience* 2008;151:232-41.
87. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:11946-50.
88. Lafuente JV, Argandoña EG, Mitre B. VEGFR-2 expression in brain injury: its distribution related to brain-blood barrier markers. *J Neural Transm* 2006;113:487-96.
89. Chi OZ, Hunter C, Liu X, Weiss HR. Effects of anti-VEGF antibody on blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2007;204:283-7.
90. Svensson B, Peters M, König HG, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:1170-5.
91. Sivakumar V, Lu J, Ling EA, Kaur C. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide production in response to hypoxia in the choroid plexus in neonatal brain. *Brain Pathol* 2008;18:71-85.
92. Bellomo M, Marini H, Adamo EB, et al. Vascular endothelial growth factor induces brain erythropoietin expression? *Funct Neurol* 2006;21:87-91.
93. Fahey J, King TL. Intrauterine asphyxia: clinical implications for providers of intrapartum care. *J Midwifery Womens Health* 2005;50:498-506.

94. Johshita H, Asano T, Matsui T, Koide T. Effects of protein kinase C agonists on Na, K-ATPase activity in rat brain microvessels. *Adv Exp Med Biol* 1993;331:61-4.
95. Miskowiak K, Inkster B, Selvaraj S, Goodwin G, Harmer C. Erythropoietin has no effect on hippocampal response during memory retrieval 3 days post-administration. *Psychopharmacology* 2007;195:451-3.
96. Castillo-Meléndez M, Yan E, Walker DW. Expression of erythropoietin and its receptor in the brain of late-gestation fetal sheep, and responses to asphyxia caused by umbilical cord occlusion. *Dev Neurosci* 2005;27:220-7.
97. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643-51.
98. Springborg JB, Møller C, Gideon P, Jørgensen OS, Juhler M, Olsen NV. Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a double blind randomised clinical trial. *Acta Neurochir* 2007;149:1089-101.
99. Fahnenstich H, Dame C, Alléra A, Roskamp R, Kowalewski S. Erythropoietin as a biochemical parameter for fetal hypoxia. *Klin Padiatr* 1995;207:326-30.
100. Góra-Kupilas K, Joško J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol* 2005;43:31-9.
101. Alvarez Arroyo MV, Castilla MA, González Pacheco FR, et al. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1998 ;9:1998-2004.
102. Valable S, Montaner J, Bellail A, et al. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:1491-504.
103. Sköld MK, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist AC, Mathiesen T, Holmin S. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma* 2005;22:353-67.
104. Hai J, Li ST, Lin Q, Pan QG, Gao F, Ding MX. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain. *Neurosurgery* 2003;53:963-70.

105. Maurer MH, Tripps WK, Feldmann RE Jr, Kuschinsky W. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett* 2003;344:165-8.
106. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002;417: 954–958.
107. Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, et al. Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *J Biol Chem* 2002;277:11410-5.
108. Chi OZ, Hunter C, Liu X, Weiss HR. Effects of VEGF and nitric oxide synthase inhibition on blood-brain barrier disruption in the ischemic and non-ischemic cerebral cortex. *Neurol Res* 2005;27:864-8.
109. Kim HY, Choi JS, Cha JH, Choi JY, Lee MY. Expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1 in embryonic rat forebrain. *Neurosci Lett* 2007;425:131-5.
110. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:10242-7.
111. Yang SZ, Zhang LM, Huang YL, Sun FY. Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;274:851-6.
112. Schänzer A, Wachs FP, Wilhelm D, et al Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 2004;14:237-48.
113. Ding XM, Mao BY, Jiang S, Li SF, Deng YL. Neuroprotective effect of exogenous vascular endothelial growth factor on rat spinal cord neurons in vitro hypoxia. *Chin Med J* 2005;118:1644-50.

Ek Tablo I. Kontrol grubunun morfolojik skorlama verileri

				Person expanting:			
Date	Explantation time	Start:	Finish:	RAT NUMBER			
	Scoring time	Start:	Finish:	NUMBER OF EMBRYOS			
Cultur medium	KONTROL GRUBU			RESORBED EMBRYOS			
Details:				DEMAGED EMBRYOS			
				TOTAL USED			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
YOLK SAC CIRCULATION	4	3	3	5	3	5	4	4	4	4
ALLANTOIS	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
FLEXION	5	4	4	5	4	5	5	5	5	5
HEART	4	2	3	3	4	5	4	4	4	4
CAUDAL NEURAL TUBE	5	3	3	3	3	4	4	4	4	4
HIND BRAIN	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5
MID BRAIN	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5
FORE BRAIN	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5
OTIC SYSTEM	5	3	4	4	4	5	4	4	5	4
OPTIC SYSTEM	5	3	4	4	4	5	4	4	5	4
OLFACTORY SYSTEM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
BRANCHIAL BARS	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2
MAXILLARY PROCESS	2	1	2	2	1	3	3	2	3	2
MANDIBULAR PROCESS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
FORE LIMB	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
HIND LIMB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOMİTES	4	3	3	3	3	5	4	4	5	4

TOTAL SCORE	59	42	49	52	48	65	60	58	62	58
MEAN YOLK SAC DIAMETER	5,7	5,6	5,5	6	5	6,5	5,8	5,8	5,6	5,5
CROWN RUMP LENGTH	5	4,1	4,2	5,2	4,8	5,8	5,5	5,4	4,2	4,2
SOMITE NUMBER	23	16	19	18	19	26	25	24	27	24
EMBRYO PROTEIN CONTENT										
YOLK SAC PROTEIN CONTENT										

Ek Tablo II. Hipoksi grubunun morfolojik skora verileri

				Person expanting:			
Date	Explantation time	Start:	Finish:	RAT NUMBER			
	Scoring time	Start:	Finish:	NUMBER OF EMBRYOS			
Cultur medium	HİPOKSİ GRUBU			RESORBED EMBRYOS			
Details:				DEMAGED EMBRYOS			
				TOTAL USED			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
YOLK SAC CIRCULATION	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
ALLANTOIS	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
FLEXION	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2
HEART	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3
CAUDAL NEURAL TUBE	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
HIND BRAIN	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2
MID BRAIN	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2
FORE BRAIN	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2
OTIC SYSTEM	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
OPTIC SYSTEM	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
OLFACTORY SYSTEM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRANCHIAL BARS	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
MAXILLARY PROCESS	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
MANDIBULAR PROCESS	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
FORE LIMB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HIND LIMB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOMİTES	2	1	1	1	1	3	2	1	1	2

TOTAL SCORE	23	21	21	22	22	28	30	17	17	29
MEAN YOLK SAC DIAMETER	5,5	6,2	5,5	5,5	4,5	4,5	5	5,5	4,5	4,1
CROWN RUMP LENGTH	2,4	2,3	2,5	2,3	2,1	3,3	3,6	3,7	3,1	2,5
SOMITE NUMBER	11	10	10	9	8	16	13	6	5	15
EMBRYO PROTEIN CONTENT										
YOLK SAC PROTEIN CONTENT										

Ek Tablo III. EPO1 grubunun morfolojik skorlama verileri

				Person expanting:		
Date/...../.....	Explantation time	Start:	Finish:	RAT NUMBER		
	Scoring time	Start:	Finish:	NUMBER OF EMBRYOS		
Cultur medium	200 Ü/ml EPO			RESORBED EMBRYOS		
Details:				DEMAGED EMBRYOS		
				TOTAL USED		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
YOLK SAC CIRCULATION	2	2	1	2	4	3	3	2	2	2
ALLANTOIS	2	2	1	2	3	3	3	2	2	2
FLEXION	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2
HEART	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
CAUDAL NEURAL TUBE	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2
HIND BRAIN	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2
MID BRAIN	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2
FORE BRAIN	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2
OTIC SYSTEM	2	2	24	3	3	3	3	3	3	3
OPTIC SYSTEM	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
OLFACTORY SYSTEM	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
BRANCHIAL BARS	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
MAXILLARY PROCESS	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1
MANDIBULAR PROCESS	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
FORE LIMB	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1
HIND LIMB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SOMİTES	2	2	2	4	3	3	3	2	2	2

TOTAL SCORE	33	34	31	43	41	42	42	32	32	32
MEAN YOLK SAC DIAMETER	3,5	2,25	4	6,25	5,7	5,1	5,3	4	4	3,5
CROWN RUMP LENGTH	2,7	2,6	3,1	3,5	3	2,5	2,5	2,5	2	2,5
SOMITE NUMBER	15	15	14	21	16	16	15	14	13	13
EMBRYO PROTEIN CONTENT										
YOLK SAC PROTEIN CONTENT										

Ek Tablo IV. EPO2 grubunun morfolojik skorlama verileri

				Person expanting:			
Date/...../.....	Explantation time	Start:	Finish:	RAT NUMBER			
	Scoring time	Start:	Finish:	NUMBER OF EMBRYOS			
Cultur medium	100 Ü/ml EPO			RESORBED EMBRYOS			
Details:				DEMAGED EMBRYOS			
				TOTAL USED			

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
YOLK SAC CIRCULATION	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
ALLANTOIS	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
FLEXION	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
HEART	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
CAUDAL NEURAL TUBE	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
HIND BRAIN	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
MID BRAIN	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
FORE BRAIN	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
OTIC SYSTEM	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
OPTIC SYSTEM	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
OLFACTORY SYSTEM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BRANCHIAL BARS	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
MAXILLARY PROCESS	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
MANDIBULAR PROCESS	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
FORE LIMB	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HIND LIMB	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
SOMİTES	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2

TOTAL SCORE	16	16	17	17	16	16	18	27	27	27
MEAN YOLK SAC DIAMETER	6,25	5,25	5,5	5,75	4,5	4,2	4,3	5,5	3,5	5,5
CROWN RUMP LENGTH	2,3	2,5	2,5	3	2,5	2,5	3	2	2,5	2
SOMITE NUMBER	6	6	7	6	7	6	8	12	11	12
EMBRYO PROTEIN CONTENT										
YOLK SAC PROTEIN CONTENT										

Ek Tablo V. EPO3 grubunun morfolojik skorlama verileri

				Person expanting:		
Date/...../.....	Explantation time	Start:	Finish:	RAT NUMBER		
	Scoring time	Start:	Finish:	NUMBER OF EMBRYOS		
Cultur medium	50 Ü/ml EPO			RESORBED EMBRYOS		
Details:				DEMAGED EMBRYOS		
				TOTAL USED		

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
YOLK SAC CIRCULATION	3	2	1	2	1	1	1	1	3
ALLANTOIS	3	2	1	2	1	1	1	1	2
FLEXION	3	2	2	2	1	1	1	2	3
HEART	3	2	2	2	2	2	2	2	2
CAUDAL NEURAL TUBE	3	2	2	2	2	1	2	1	2
HIND BRAIN	2	2	2	2	1	1	1	2	3
MID BRAIN	2	2	2	2	1	1	1	2	3
FORE BRAIN	2	2	2	2	1	1	1	2	3
OTIC SYSTEM	2	2	2	2	1	1	1	1	2
OPTIC SYSTEM	2	2	2	2	0	1	1	1	2
OLFACTORY SYSTEM	1	1	1	1	0	1	1	2	1
BRANCHIAL BARS	2	0	1	1	0	1	1	0	1
MAXILLARY PROCESS	1	0	1	1	0	1	1	0	1
MANDIBULAR PROCESS	2	1	2	2	1	1	1	1	1
FORE LIMB	1	1	1	1	1	1	1	0	1
HIND LIMB	1	0	1	1	0	0	0	0	0
SOMİTES	3	1	2	2	0	1	1	1	2

TOTAL SCORE	36	24	26	28	13	17	18	19	32
MEAN YOLK SAC DIAMETER	4,4	4,5	4	4,6	4,7	4,5	5,7	4,9	5,2
CROWN RUMP LENGTH	3,2	2,8	3,3	3,2	2,5	3	2,7	2	3,5
SOMITE NUMBER	16	10	12	11	4	6	8	12	14
EMBRYO PROTEIN CONTENT									
YOLK SAC PROTEIN CONTENT									

