



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**Tavuk Embriyosu Koriyonallantoyik Membran Modelinde Amiodaron HCl'ün
Anjiogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Dr. Oğuz KARAHAN

UZMANLIK TEZİ

SİVAS

2011



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

KALP ve DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**Tavuk Embriyosu Koriyonallantoyik Membran Modelinde
Amiodaron HCl'ün Anjiogenez Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Dr. Oğuz KARAHAN

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erhan ATAHAN

SİVAS

2011

TEŞEKKÜR

Anjiyogenez gibi, Kalp ve Damar Cerrahisi için önemli bir temel bilim araştırma alanında böyle bir çalışmayı gerçekleştirme konusunda beni yönlendiren Doç. Dr. Erhan ATAHAN ve araştırmamda desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Anabilim Dalımızın öğretim üyeleri olan Doç. Dr. Öcal BERKAN, Yrd. Doç. Dr. Şinasi MANDUZ ve Yrd. Doç. Dr. Nurkay KATRANCIOĞLU'na ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tavuk embriyosu koriyoallantoyik membran modeli kullanılan çalışmamızın gerçekleştirilmesinde bilgi ve yöntem açısından yardımları olan ve CÜTFAM laboratuvar ortamında araştırmanın deneylerinin gerçekleştirilmesinde teknik destek vermiş ve deneylere katılmış olan sayın Doç. Dr. Zübeyde Akın POLAT'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamın yazılması aşamasında, önceden yaptığı çalışmalarla birikimini esirgemeyen Dr. Çağlar YILDIZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Oğuz KARAHAN

ÖZET

Embriyolojik büyüme ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynayan anjiyogenez, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerce etkin bir biçimde sınırlandırılır ve dengede tutulur. Bu kontrol mekanizmalarının bozulması, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabetik retinopati ve romatoid artrit gibi problemlerin etyopatogenezinde etkin bir rol oynar. Koriyoallantoyik membran modeli ilaçların antianjiyogenik etkilerinin araştırılmasında değerli bir yöntem olarak kabul görmektedir. Kardiyak ritm bozuklukları sıklıkla vasküler patolojilerinde iştirak ettiği hastalıklardır. Bu çalışmanın amacı antiaritmik olarak sıkça kullanılan Amiodaron HCl'ün antianjiyogenik etkilerinin koriyoallantoyik membran modelinde araştırılmasıdır. Çalışmada Amiodaron HCl'ün antianjiyogenik etkisi, ilaç eklenmemiş parafin ile muamele edilen negatif kontrol grubu ve bu modelde daha önce antianjiyogenik etkinliği net olarak gösterilmiş olan, vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörü Bevasizumab eklenmiş pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Çalışmada bu ilaçların 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} molar (M) konsantrasyonları uygulandı. İlaç uygulamaları sonrasında ilaçların anjiyogenez üzerine olan etkilerini değerlendirmek için tavuk embriyosu koriyoallantoyik membranı üzerindeki damar yapıları stereoskopik mikroskop altında değerlendirildi. Amiodaron HCl'ün 10^{-4} M konsantrasyonlarının antianjiyogenik etki puanları 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarından anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Bevasizumab'ın ise 10^{-4} M ve 10^{-5} M konsantrasyonlarının antianjiyogenik etki puanları 10^{-6} M konsantrasyonundan anlamlı düzeyde yüksek bulundu [0 (1-1)' e karşılık 0,5 (0,5-1,0) ve 0,5 (0,5-1,0), sırasıyla; $p < 0,05$]. Amiodaron'un bu etkisi antiaritmik amaçlı rutin dozun belirlenmesinde önemli olabilir. Hastanın vasküler devamlılığının önem arz ettiği bu tip hastalıklarda antianjiyogenik etkinin ortaya konmasıyla daha çok fayda sağlanabilir.

Anahtar sözcükler: Koriyoallantoyik membran, anjiyogenez, Amiodaron HCl, Bevasizumab.

SUMMARY

Angiogenesis which plays significant roles in a variety of physiological processes such as embryonic growth and wound healing, is strictly delimited and finely tuned by a balance of proangiogenic and antiangiogenic factors. These control mechanisms may fail and result in formation of a pathologic capillary network during the development of many diseases including cardiovascular disorders, cancer, diabetic retinopathy and rheumatoid arthritis. The chorioallantoic membrane model is considered to be a valuable method for investigation of antiangiogenic effects of drugs. Cardiac rhythm disorders are diseases that often accompanied with vascular pathologies. The purpose of this study is to investigate the antiangiogenic effects of the Amiodarone HCl which is frequently used as anti-arrhythmic, in the chorioallantoic membrane model. In this study, the antiangiogenic effect of Amiodarone HCl was compared with negative control group that dealt pure paraffine and vascular endothelial growth factor inhibitor Bevacizumab added positive control group which which has been shown as clearly antiangiogenic activity in this model previously. The concentrations of 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} M of each drugs were administered. For the purpose of determining the antiangiogenic effects of the drugs, blood vessels of the chorioallantoic membranes were evaluated using a stereoscopic microscope. The antiangiogenic effect scores of Amiodarone HCl at the dose of 10^{-4} molar (M) were significantly higher than those of 10^{-5} M and 10^{-6} M. The antiangiogenic effect scores of Bevacizumab at the concentration of 10^{-4} M and 10^{-5} M were significantly higher than those of 10^{-6} M [0 (1-1) vs. 0,5 (0,5-1,0) and 0,5 (0,5-1,0), respectively; $p < 0,05$]. This effect of Amiodarone

may be important for determining the routine antiarrhythmic dose. The optimum benefit can be achieved with the revealing of antiangiogenic effect in such these diseases.

Keywords: Chorioallantoic membrane, angiogenesis, Amiodarone HCl, Bevacizumab.

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Doç Dr. Öcal Berkan

Doç Dr. Erhan Atahan

Yrd. Doç. Dr. Nurkay Katrancıoğlu

Bu tez, 17.10.2011 tarih ve sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gökhan KÖYLÜOĞLU

Tıp Fakültesi Dekanı

SİMGELER ve KISALTMALAR

M; Molar

bFGF; Basic fibroblast growth factor, Temel fibroblast büyüme faktörü

BM; Basal membrane, Bazal membran

ESM; Extracellular matrix, Ekstraselüler matriks

HER-2; Human epidermal growth factor receptor 2, İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2

HIF-1; Hypoxia-inducible transcription factor-1, Hipoksiyle indüklenebilir transkripsiyon faktörü-1

IGF-1; Insulin-like growth factor-1, İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IL-1; Interleukin-1, İnterlökin-1

IL-1 β ; Interleukin-1 beta, İnterlökin 1 beta

IL-6; Interleukin-6, İnterlökin-6

IL-10; Interleukin-10, İnterlökin-10

IL-13; Interleukin-13, İnterlökin-13

CAM; Chorioallantoic membrane

KAM; Koriyoallantoyik membran

kDa; KiloDalton

MMP; Matrix metalloproteinase, Matriks metalloproteinaz

NO; Nitric oxide, Nitrik oksit

PA; Plasminogen activator, Plazminojen aktivatörü

PDGF; Platelet derived growth factor, Platelet kökenli büyüme faktörü

PDGFR; Platelet derived growth factor receptor, Platelet kökenli büyüme faktörü reseptörü

PlGF-1; Placenta growth factor 1, Plasenta büyüme faktörü 1

TGF- α ; Transforming growth factor alpha, Transforme edici büyüme faktörü alfa

TGF- β ; Transforming growth factor beta, Transforme edici büyüme faktörü beta

TNF α ; Tumor necrosis factor alpha, Tümör nekroz faktör alfa

tPA; Tissue plasminogen activator, Doku plazminojen aktivatörü

uPA; Urokinase type plasminogen activator, Ürokinaz tip plazminojen aktivatörü

VEGF; Vascular endothelial growth factor, Vasküler endotelial büyüme faktörü

VEGFR-1; Vascular endothelial growth factor receptor 1, Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1

VEGFR-2; Vascular endothelial growth factor receptor 2, Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 2

VEGFR-3; Vascular endothelial growth factor receptor 3, Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 3

TABLolar

Tablo 2.1. Koriyoallantoyik membran (KAM) modeliyle çalışmanın avantaj ve dezavantajları.

Tablo 3.1. Koriyoallantoyik membran üzerinde antianjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı

Tablo 4.1. Amiodaron'un farklı dozlarda angjiyogenik skorlaması

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Anjiyogenezin başlangıç evreleri

Şekil 2.2. Vasküler devamlılığın kollateral dolaşım ile sağlanması

Şekil 2.3. Tavuk embriyosu ve KAM'ın stereoskopik mikroskop altındaki görünümü

Şekil 2.4. Amiodaron HCl'ün yapısal formülü

Şekil 3.1. Döllenen tavuk yumurtasının şematik gösterimi

Şekil 3.2. Döllenen tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması

Şekil 3.3. Kuluçkanın 5. gününde yumurtaların açılması

Şekil 3.4. KAM modelinde Amiodaron çalışılması aşamaları

Şekil 3.5. Koriyoallantoyik membran modeli

Şekil 4.1. Bevasizumab'ın 10^{-6} M ve Amiodaron'un 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları

İÇİNDEKİLER

| | <u>SAYFA</u> |
|--|--------------|
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) | v- vi |
| ONAM SAYFASI | vii |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | viii, ix |
| TABLolar | x |
| ŞEKİLLER | xi |
| GİRİŞ | 1 |
| GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. Anjiyogenez | 2 |
| 2.1.1. Anjiyogenez Mekanizması | 3 |
| 2.1.2. Anjiyogenez ve Kardiyovasküler Sistem | 6 |
| 2.1.3. Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerde Anjiyogenez | 9 |
| 2.2. Koriyoallantoyik Membran Modeli | 11 |
| 2.3. Amiodaron HCl | 15 |
| 2.5. Bevasizumab | 19 |
| GEREÇ ve YÖNTEM | 23 |
| 3.1. Pelletlerin Hazırlanması | 23 |

| | |
|----------------------------------|----|
| 3.2. KAM Deneyi | 23 |
| 3.3. İstatistiksel Değerlendirme | 26 |
| BULGULAR | 30 |
| TARTIŞMA | 32 |
| SONUÇ ve ÖNERİLER | 36 |
| KAYNAKLAR | 38 |

GİRİŞ

Anjiyogenez ve vaskülogenez, hayatın hem doğum öncesi hem de doğum sonrası dönemlerde gerçekleşen olaylardır. İntrauterin yaşamda kök hücrelerden gelişen öncü hücrelerin bir alt tipi olan farklılaşmamış mezenşimal hücreler dönüştükleri anjiyogenik hücre toplulukları aracılığıyla embriyonal dokularda ilk anjiyogenik alanları oluştururlar. Bu yapılardan vaskülogenezin ilk aşamasını temsil eden ilkel damar tüpçükleri meydana gelir. Böylece, embriyonal dokuda başlayan anjiyogenik süreç vaskülogenik aşama ile devam eder. Vaskülogenez bir yandan sürerken, diğer yandan yeni anjiyogenik odaklar da oluşmaya başlar. Böylece farklılaşmamış bir hücre grubundan damar oluşumu gerçekleşir. Postnatal hayatta ise var olan damar endotelinin çoğalması ile yeni endotel hücreleri ortaya çıkar ve anjiyogenez gerçekleşir (1-3).

Embriyogenez dışında, yetişkinlerde anjiyogenez yaralanma sonrası doku yenilenmesi ve menstrüel siklusta endometriyal proliferasyon ve sekresyon gibi çok sınırlı olaylarda görülmektedir. Son yıllarda, batı ülkelerinde yaygın olan birçok hastalığın patogenezinde artmış anjiyogenezin önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır. Antianjiyogenik tedaviler ateroskleroz, artrit, osteomyelit, kanser, primer pulmoner hipertansiyon, diyabetik retinopati ve over kistleri gibi kronik hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli rol oynayabilir. Bununla birlikte kardiyovasküler olaylarda ise anjiyogenez vasküler devamlılığın ve gerekli kollateral dolaşımın sağlanması için ciddi önem arz eder. Bu nedenle anjiyogenez konusu günümüzde üzerinde sık çalışılan bir konudur (1-3).

Anjiyogenez birçok hücre tipinin, çok sayıda molekülün katıldığı karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir. İn vitro modeller bu süreçle ilgili önemli bilgiler sunmakla birlikte, in vivo süreci tam olarak yansıtamaz. Anjiyogenez araştırmalarında çok yaygın olarak kullanılan bir in vivo model, tavuk embriyosu Koriyoallantoyik Membran (KAM) modelidir. Bu model, ilaçların

antianjiyogenik potansiyellerini araştırmak için duyarlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir in vivo testtir.

GENEL BİLGİLER

Anjiyogenez; vasküler sistemin devamlılığı, geçirilmiş veya yeni meydana gelecek hastalığın organizma da oluşturacağı etkinin belirlenmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Özellikle, dolaşım sisteminde yeni oluşan kollaterallerin, ana damarların aıklılığının kesintiye uğraması durumunda, hayati önem taşıdığıının görölmesi daha fazla araştırmacıyı bu konuya yöneltmiştir. Yeni geliştirilen ilaçların anjiyogenez üzerine etkileri önce tavuk embriyosu KAM modeli gibi temel bilim deneyleri ile değerlendirilmektedir.

Bu tez araştırmasında tavuk embriyosu KAM modelinde çeşitli araştırmalarda doğrudan veya dolaylı olarak antianjiyogenik özellikleri gösterilmiş olan Bevasizumab ve nitrik oksit gibi mekanizmalar üzerinden vasküler sistem üzerine önemli etkiler sağlayabileceği öngörülen Amiodaron HCl'ün, anjiyogenez üzerine olan etkileri incelendi. Araştırma yönteminin ve bulguların daha iyi anlaşılabilmesi için anjiyogenez, tavuk embriyosu KAM modeli ve araştırma ilaçlarının farmakolojik özellikleri konusunda güncel literatür eşliğinde bilgi sunuldu.

2.1. Anjiyogenez

Anjiyogenez daha önceden var olan vasküler sistemden yeni kan damarı oluşumu sürecidir. Embriyogenez süresince yeni kan damarı gelişimi esas olarak vaskülogenez ve anjiyogenez ile meydana gelir (1). Vaskülogenez terimi, anjiyoblast olarak adlandırılan kök hücrelerden kaynaklanan endotelial hücrelerin primer kapiller pleksusu oluşturmak üzere farklılaşıp bir araya gelmesini tanımlar. Bu primitif ağ oluşumunun tomurcuklanma, dallanma ve iç içe geçen büyüme şeklindeki farklılaşmasına anjiyogenez denir. Böylelikle mevcut kapiller damarlardan yeni kapiller damarlar

meydana gelir. Arteriyogenez bu damar tomurcuklarının sonraki dönemde damar duvarının diğer elemanları ile birlikte stabilizasyonunu ve geniş kan damarlarının oluşumunu ifade eder.

Erişkinlerde anjiyogenez yara iyileşmesi, doku beslenmesi ve tamiri ve menstrüel siklus gibi birçok fizyolojik süreçte ortaya çıkar. Patolojik anjiyogenez ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda meydana gelir (2). Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların etkin tedavisinde anjiyogenik sinyallere müdahaleler güncel araştırmalarda sıkça ele alınmaktadır. Pozitif proangiogenic stratejiler, iskemik bölgelere kollateral dolaşımın sağlanması için gerekliken, negatif antianjiyogenik stratejiler, aterosklerotik lezyonun içinde fibromusküler çoğalmanın önlenerek açıklığın korunması için önem oluşturmaktadır (3).

2.1.1. Anjiyogenez Mekanizması

Anjiyogenez süreci pozitif ve negatif etkili moleküller arasındaki denge ile kontrol edilir. Pozitif etkili proanjiyogenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Bu kavram, "anjiyogenik anahtar (switch)" olarak adlandırılır (4).

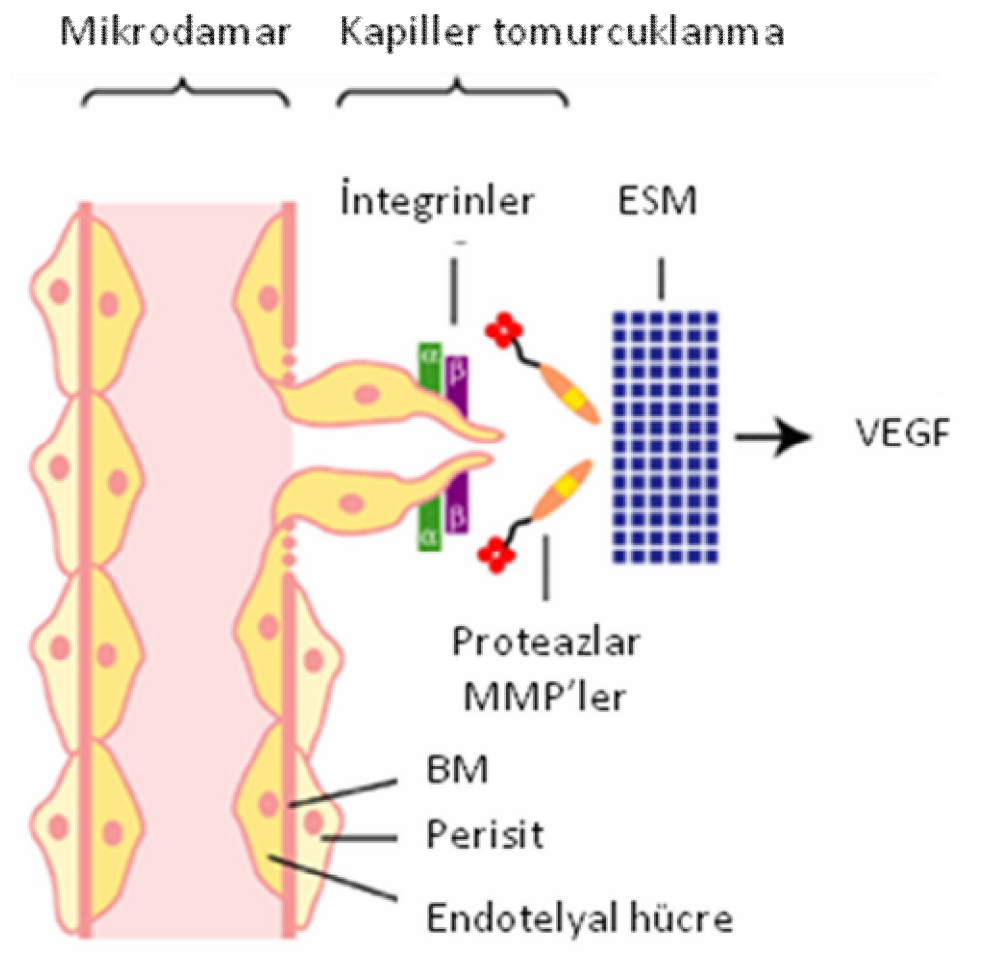
Anjiyogenez bir dizi olayı içeren çok basamaklı bir süreçtir. Anjiyogenez, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), tümör nekroz faktör alfa (TNF α) ve VEGF gibi anjiyogenik faktörlerin endotel aktivasyonu yapmak üzere çevre dokudan salınımı ile başlar (5). Bazal membranın proteolitik enzimler tarafından yıkılması bu basamaklardan ilkidir. Endotel hücreleri yayılma etkisi göstermeyen tek bir tabaka halinde bulunurlar. Anjiyogenez sürecinde göç etmek ve çoğalmak üzere uyarıldıklarında membran ve hücreler arasında bir bölünme meydana gelir ve sayıları giderek artmaya başlar. Endotel hücrelerinden salınan anjiyogenik büyüme faktörleri komşu dokulara diffüzyon yolu ile geçerler. Bu büyüme faktörleri çevre kan damarlarındaki endotel hücrelerinde bulunan özgün reseptörlere

bağlanırlar. Hücre içi anjiyogenez uyarısının başlamasıyla bazal membran ve ekstrasellüler matriks hasarına yol açan serin proteazlar ve matriks metalloproteinazlar gibi proteolitik enzimlerin salınımı gerçekleşir. Endotel hücrelerinin damar duvarı dışına kaçıışı başlar. Ürokinaz-tip (uPA) ve doku-tip (tPA) plazminojen aktivatörleri plazminojeni plazmine çeviren serin proteazları grubuna aittirler (6). Endotel hücrelerinin invazyon ve göç süreçleri, plazminojen aktivatör (PA) ve matriks metalloproteinaz (MMP) sisteminin işbirliği içinde aktive olmasını gerektirir. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü ikinci basamak olarak değerlendirilir. Bu yeni immatür damarlar endotelial hücrelerin migrasyonu ve büyümesini sağlamak için endotelium üzerinde boşluklar içerirler (7). Anjiyogenik uyarı, proteolitik yıkımı takiben endotel hücreleri aktive eder. Bu süreçte en etkili anjiyogenik faktör VEGF'dür (8). Kapiller oluşumu ve damar olgunlaşması anjiyogenezin üçüncü basamağıdır. Prolifere olan endotel hücreleri integrinlerin yardımıyla çevre matrikse göç ederler ve komşu damar tomurcuğunu oluştururlar (9). Kapiller filizlenmenin ucunda yeni oluşmuş ekstrasellüler matrikste yıkılma ortaya çıkar, böylece yayılımın devam etmesi sağlanır. Endotel hücre çoğalmasından sonra ekstrasellüler matriks bileşenlerinin depolanması ve bir araya getirilmesi için ekstrasellüler proteoliz mutlaka lokal olarak inhibe edilmelidir. Endotel hücrelerinin çoğalması ve ilerlemesi sırasında hücre içi ve hücreler arası boşluklar oluşmaya başlar. Hücreler anjiyogenez alanına göç ettikçe damar tomurcuğu tüp şeklini alır ve sonrasında damar lümenini oluşturur (5). Böylece, ekstrasellüler matriks proteolizinin birbirini sırayla izleyen aktivasyon ve inhibisyonları sonucunda kapillerler oluşur (Şekil 2.1).

Proteolitik yıkılma ve endotel hücresi göçünden sonra yeni oluşan kapillerler bazal membranı oluştururlar. Endotel hücrelerinin yeni kapiller yapılar oluşturabilmeleri için birbirlerine ve ekstrasellüler matrikse tutunmaları gerekir. Yeni matriks oluşumu için ekstrasellüler matriks proteinleri olan fibronektin, laminin ve kollajen üretilir (10). Yeni damar

yapımı tamamlandıktan sonra anjiyogenik faktörlerde azalma görülürken, anjiyogenez inhibitörlerinde artış gözlenir. Endotel hücreleri tekrar stabil halledirler ve damarlar kan akımını başlatmaya hazır hale gelmiş olurlar. Yeni damarların tam olarak oluşmaları yaklaşık yedi gün sürer (11).

Endotelial hücreler lenf damarlarının oluşumuna da katkıda bulunurlar. Lenfatik damarlanma embriyogenez esnasında kan damarları gelişiminden kısa süre sonra gelişir ve kan damarları ile aynı kökene sahip olduğu düşünülür (12, 13). Venöz endotelial hücrelerin lenfatik uyarılara duyarlı hale geldiği ve diferansiye olarak lenfatik tomurcukları oluşturduğu varsayılır. Bununla birlikte lenfanjiyoplastların veya prekürsörlerin varlığı da kanıtlanmıştır (14).



Şekil 2.1. Anjiyogenезin başlangıç evreleri. VEGF;Vasküler endotelial büyüme faktörü, ESM;Ekstraselüler matriks, MMP;Matriks metalloproteinaz, BM;Bazal membran (Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press, 2003).

2.1.2. Anjiyogenез ve Kardiyovasküler Sistem

Aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların etkin tedavisinde anjiyogenik etkilere müdahale ederek prognozu yönlendirme çabaları yeni geliştirilen ilaçların bu alandaki etkinliklerinin araştırılmasını sağlamıştır. Miyokard perfüzyonun sağlanması için vasküler devamlılık önemlidir. Kan akımının emboli, tromboz ve ateroskleroz gibi durumlarda kesintiye uğraması

durumunda kollateral dolaşım doku perfüzyonu için hayati önem taşır (Şekil 2.2).

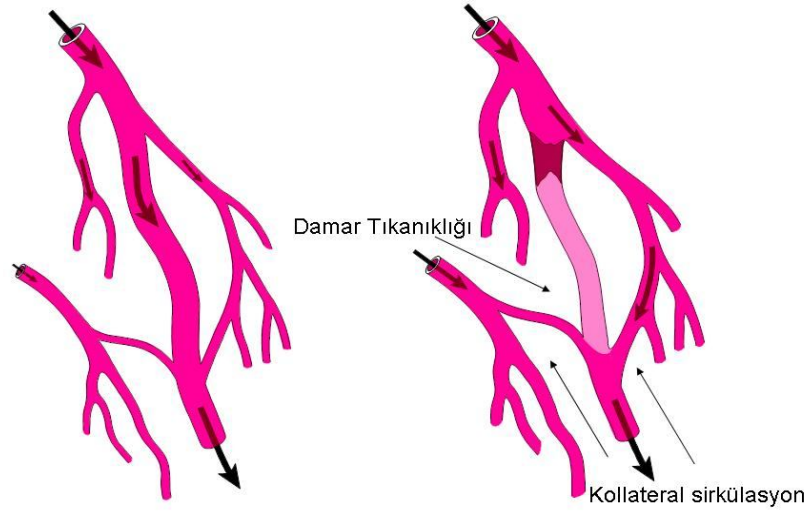
Terapotik Anjiyogenez; Dokuların perfüzyonu için gerekli olan vasküler devamlılığın sağlanması için anjiyogenik etki elde edilmesi ya da en azından verilecek tedavilerin antianjiyogenik etkilerinin minimize edilmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte ateroskleroz gibi damar lümenini daraltan olaylarda fibromusküler dokunun gelişimini geriletme veya vasküler stent gibi açıklığın sağlanmasına destek cihazların tıkanmasını önlemek için antianjiyogenik etkiler sağlanmaya çalışılmıştır (3). Yetersiz anjiogeneze bağlı, yetersiz kan akımından kaynaklanan kalp ve diğer dokulardaki hipoksi birçok kardiyovasküler hastalıkların seyrini belirler. Koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı, diyabetin vasküler komplikasyonları ve inme gibi hastalıklar bu tip anjiyogenez bağımlı hastalık gruplarındandır. Normal şartlar altında, anjiyogenez stimülasyonu için büyüme faktörleri, proteinler, inflamatuvar ve immün etkilerin uyardığı bir dizi kimyasal sinyalin aktive olması gerekmektedir. Bu doğal sürece yara iyileşmesi iyi bir örnektir. Kardiyovasküler doku rejenerasyonu, anjiyogenezin uyarılması ile direkt ilişkilidir. Koroner tıkanıklıklarda, hipoksik miyokardın beslenmesi için kollateraller gelişmeye başlar. Bu etki kronik olaylarda akut hasarın önlenmesi için mutlaka gereklidir. Koroner anjiyogenezinin sağlanmasında VEGF dışında, FGF, PlGF, PDGF, anjiyopoietinler gibi daha birçok anjiyogenik faktörler, neovaskülarizasyona katkıda bulunur. Bu durum araştırmacıları, yeni potent faktörleri ve bu faktörleri uyanan sistemleri aktive eden maddeleri araştırmaya yöneltmiştir. Tedavi amaçlı anjiyogenez, kardiyovasküler hastalıklar, DM ve kalp-damar sistemini etkileyen diğer kronik problemlerin komplikasyonlarının tedavisi için büyük umutlar vaat etmektedir (15-22).

Başlangıçta yapılan çalışmalar kardiyovasküler hastalıklarda tedavi amaçlı anjiyogenezinin faydalarına değinse de, güncel çalışmaların bir kısmı da

artmış anjiogenezisin kardiyovasküler mortaliteyi artırabileceğine değinmiştir. Özellikle endotelial öncül hücrelerin artış göstermesi stent restenozları, vasküler darlığın artışı gibi durumlardan sorumlu tutulmuştur. Bazı çalışmalar ise primer aterosklerotik lezyonu etkilemediğini iddia edilmiştir. Kısacası bozulmuş dinamik dengenin her iki tarafa çekilmesinin de pozitif ve negatif etkileri olabileceği bildirilmiştir (23,24).

Neovaskülarizasyon hakkında birçok mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan biri var olan kan damarlarından endotelial hücrelerin önce proliferasyonu sonra migrasyonunu takiben tübüler vasküler yapılara organize olmalarını içeren tomurcuklanma anjiyogenezidir. Bir diğeri ise var olan kan damarlarının lümeni içerisinde transvasküler doku perdesinin oluşumu ve takiben kan damarının bu perde ile ayrılarak iki yeni damar oluşturmasını ifade eden intussusseptif anjiyogenezdir (25). Yeni damarlar, dolaşan endotelial progenitör hücreleri kullanarak da gelişebilirler. Şimdi artık kapsamlı veriler bu hücrelerin varlığını ve yeni damar oluşumuna olan katkılarını desteklemektedir (26, 27).

Nitrik oksidin de bu mekanizmalardaki rolü sıkça tartışılmıştır. Bazal vasküler tonusun önemli bir belirleyicisi olan nitrik oksit trombosit aktivasyonunu önler, endotele lökosit adezyonunu sınırlar ve miyokardiyal kontraktileti düzenler (28-30). Kardiyovasküler sistemde modülatör görevi üstlendiği belirtilen nitrik oksidin neovaskülarizasyon üzerine etkileri tartışılmaya başlanmıştır. Doku iskemisinde antioksidan mekanizmalarla birlikte, endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımının arttığı gösterilmiştir (31). Nitrik oksit salınımının VEGF üzerinden anjiyogenez oluşumuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Hatta tedavi amaçlı anjiyogenezin araştırıldığı bazı çalışmalar, nitrik oksit üzerinden yürütülmüştür (32-33). Bu çalışmaların sonucunda nitrik oksidin de anjiyogenezi ve vasküler permeabiliteyi arttırdığı gösterilmiştir (31-34).



Şekil 2.2. Vasküler devamlılığın kollateral dolaşım ile sağlanması (LifeART Collection Images Copyright © 1989-2001 by Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD)

2.1.3. Fizyolojik ve Patolojik Süreçlerde Anjiyogenez

Anjiyogenez yara iyileşmesi ve epitelizasyon için çok önemli bir basamaktır. Yaralanan dokunun iyi beslenmesi ve yeterli kan akımının sağlanması iyileşmeyi etkileyen önemli bir parametredir. Anjiyogenez olmazsa oksijen ve besin desteği olmayacaktır, dolayısıyla yara yerine makrofaj ve fibroblastların invazyonu da gerçekleşemeyecektir. Anjiyogenez, hipoksi, büyüme faktörleri, matriks komponentleri ve metabolik durum gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (35). Yara yerinde oksijen basıncının düşük olması, laktik asit birikimi, trombosit ve makrofajların transforme edici büyüme faktörü alfa ($TGF-\alpha$), transforme edici büyüme faktörü beta ($TGF-\beta$), $TNF-\alpha$ gibi anjiyogenik faktörleri salgılamalarını stimüle eder (36). Anjiyogenez için endotel hücre göçü ve kemotaktik faktörler büyük öneme

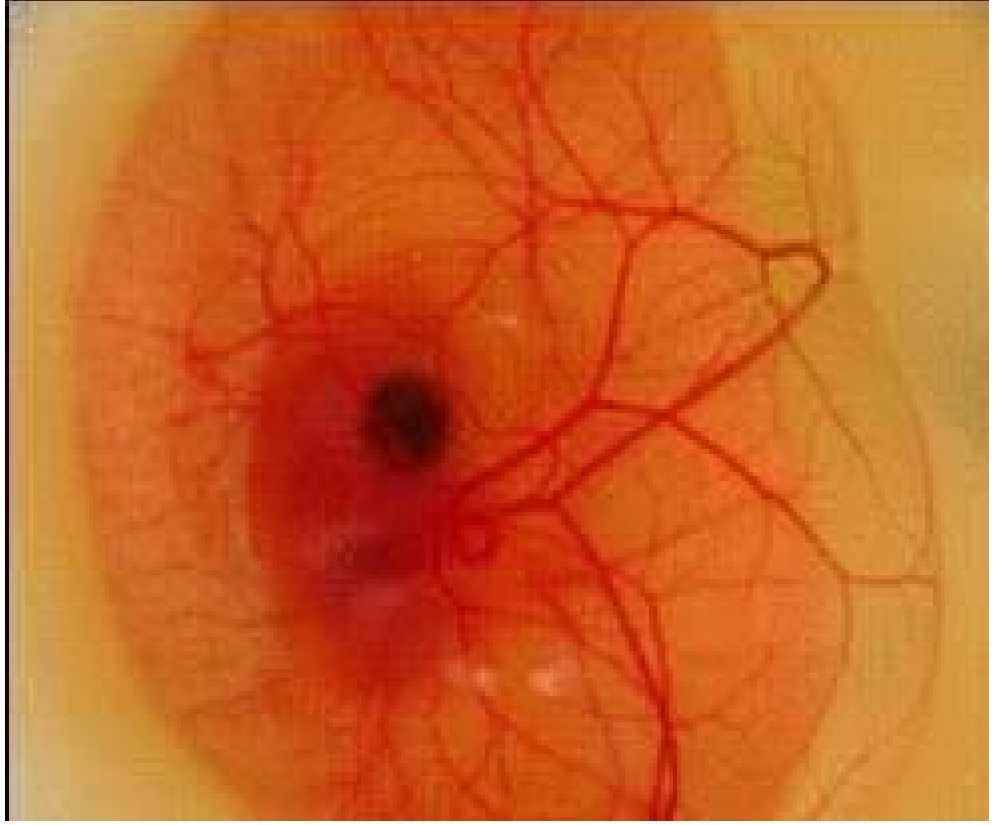
sahiptirler. Bu faktörler trombosit kökenli maddeler, heparin ve fibronektin olup, endotel hücrelerinin hareketini artırır. Endotel hücreleri tarafından üretilen fibronektin ve kollajen gibi maddeler de bu hücre hareketine yardımcı olurlar. Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) damar düz kası gelişimini uyarır. Kollajen sentez ve yıkımı da vasküler bazal membran oluşumunu düzenler (37). Yara iyileşmesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu, proliferasyonu ve matris oluşumu sonrası skar dokusu gelişir.

Anjiyogenez regülasyonunun bozulması, diyabetes mellitustaki birçok patolojinin nedenidir (27,38). Diyabetes mellituslu hastalarda; retina ve böbrek vaskülopatisi, yara iyileşmesinde yetersizlik, transplante edilen organın rejeksiyon riskinin artması ve koroner kollateral oluşumunda yetersizlik gibi durumlar gözlenir. Diyabetes mellitusta gelişen anjiyogenez regülasyonunun bozulmasını açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür: Birincisi, endotelial ve vasküler düz kas bozuklukları ile karakterize vasküler disfonksiyonun varlığıdır. İkincisi, proteinlerin nonenzimatik glikozilasyonuna ve yeni kan damarlarının bozulmuş yapılına neden olan kronik hiperglisemidir. Üçüncüsü ise diyabetin büyüme faktörü sinyali (38, 39) ve/veya ekspresyonunu (40) etkileyerek vasküler büyüme faktörlerinin lokal dengesini bozmasıdır. Diyabetik retinopatide esas rolü VEGF oynar ve salınımı bFGF, plasenta büyüme faktörü 1 (PIGF-1), TNF, TGF- β , interlökin-1 (IL-1) gibi birçok faktör tarafından artırılır. Anormal anjiyogenezin eşlik ettiği diyabetik nefropatide VEGF lokal düzeyinin çok yükseldiği ve anjiyotensin II salınımının artmış olduğu tespit edilmiştir (22). Diyabetik ayak ülserleri, bası yaraları gibi kronik yaraların bulunduğu durumlarda kan akımındaki bozulma yara iyileşmesinde gecikmeye neden olabilir (35, 41). Son dönemde yeni kan damarı oluşumunu indüklemek ve lokal iskeminin dokularda neden olduğu olumsuz etkilerden kaçınmak amacıyla anjiyogenez ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (35, 42).

2.2. Koriyoallantoyik Membran Modeli

Anjiyogenezde kullanılan başlıca in vivo modeller tavuk embriyosu KAM modeli, tavşan kornea modeli (“micropocket”), rodent mezenter modeli, sünger (“sponge”) implant modeli, matrijel ve klasik tümör modeli ve zebrafish modelidir. Uygulanması en kolay, basit, tekrarlanabilir ve anjiyogenik yanıtın kantitatif ölçümüne imkan veren çalışma modellerinin tavuk embriyosu KAM modeli ve tavşan kornea modeli olduğu kabul edilmektedir (43, 44).

KAM modeli, ilk olarak 1956 yılında kanser ve metastaz çalışmalarında, sonrasında ise 1976 yılında Folkman (45) tarafından anjiyogenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Tavuk embriyosu modeli, tümör gelişimi, anjiyogenez ve tümör hücresi yayılımı üzerine, in vivo çalışmalarda değerli bir yöntemdir. Doku kompozisyonu ve KAM’ın deneysel müdahaleler için kolay ulaşılabilir olması, tavuk embriyosu KAM modelini tümör hücrelerinin davranışını mikroskopik olarak izlemek için uygun bir yöntem haline getirmektedir (Tablo 2.1). Tavuk embriyosu model sistemi, spontan metastaz modelinde tümör hücre intravazasyonu, deneysel metastaz modelinde tümör hücre kolonizasyonu ve kollajen modelinde tümörce uyarılmış anjiyogenez gibi kanser hücresi yayılımının spesifik evre ve yönlerinin ayrıntılı analizine imkan tanır. Ekstraembriyonik bir membran olan KAM, üzerindeki vasküler yapının kolaylıkla makroskopik olarak izlenebilmesi sayesinde, antianjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.3). KAM, tavuk embriyosu fizyolojisinde gaz alış-verişini sağlayan solunum organı ve atık ürünler için mesane işlevleri yürütmektedir (46).



Şekil 2.3. Tavuk embriyosu ve KAM'ın stereoskopik mikroskop altındaki görünümü.

Bu model sistemlerinin özü, primer tümör ve anjiyogenez için eşsiz bir ortam sağlayan özel bir dokunun, KAM'ın kullanılmasıdır. Tavuk embriyosu inkübasyonu sırasında, 5.-6. günlerde KAM, koriyon ve allantoisin birleşimi ile oluşur (46, 47). Embriyonun akciğer işlevini gören KAM hızla gelişir ve inkübasyonun 12. gününde tüm embriyoyu çevreler. KAM oldukça ince bir yapıdır, nadiren üç tabakanın toplam kalınlığı 100 μm 'u geçer. Parafin kesitlerinin hematoxilen-eozin ile boyanması, bir veya iki katlı epiteliyal tabaka ve sıklıkla eritrositlerce doldurulmuş olan ince sirküler açıklıklar olarak görünen kapiller pleksustan oluşan ektoderm, stromal hücreler, kollajen lifleri ve ektodermin hemen altında yerleşik bulunan terminal kapillerler de dahil farklı çaplarda kan damarlarından oluşan mezoderm ve tek hücre tabakalı düz endodermi ortaya koyar. Ektoderm kapiller pleksus,

tavuk embriyo metastazı ve anjiyogenez modelleri için KAM'ın en önemli histolojik özelliklerinden biridir.

KAM'da anjiyogenez, gelişimsel olarak 3 safhadan oluşur:

1. Erken faz (5. günden 7. güne kadar)
2. Ara faz (8. günden 12. güne kadar)
3. Geç faz (12. veya 13. günden itibaren)

Kapiller ağın filizlenmeye başladığı dönem erken faza denk gelir. Ara fazda filizlenme sona erer ve mikrovasküler ağ gelişimi başlar. Geç fazda ise koriyoallantoyik ögeler genişlemesini tamamlar ve koruyucu bir membrana dönüşür. KAM modelinde uygulamalar 5. günden itibaren yapılabilir (48). Diğer bir görüş ise damarlanmanın olgunlaştığı 12. günden sonraki dönemin anjiyogenez çalışmaları için daha uygun olduğunu savunur (49).

Tablo 2.1. KAM modeliyle çalışmanın avantaj ve dezavantajları (50)*.

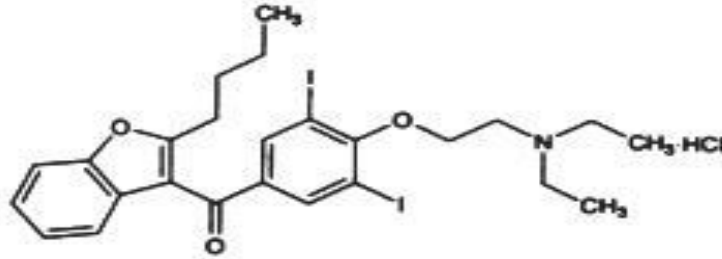
| Avantajlar | Dezavantajlar |
|--|--|
| Teknik olarak basittir | Oksijen değişikliklerine hassastır |
| Ucuzdur | Yeni damar oluşumunun ayırt edilmesi güçtür |
| Temini kolaydır | Memeli olmayan bir modeldir |
| Geniş taramalar için uygundur | Embriyoniktir |
| Noninvaziv gözleme uygundur | Non-spesifik inflamatuvar reaksiyonlar yaygındır |
| Sonuçları kolay ve çabuk değerlendirilebilir | Metabolik aktivasyona ihtiyaç duyan ilaç çalışmaları için uygun değildir |
| Memeli ksenograflarla uyumludur | |
| Etik kurul onayı gerektirmez | |
| Cerrahi girişimler için oldukça uygundur | |

*(Özgürtaş T. Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. Gülhane Tıp Dergisi 2009;51:67-69.)

2.3. Amiodaron HCl

Amiodaron HCl molekül ağırlığı 681.8 kDa olan, yeni nesil Klas III (Vaughan Williams' classification) antiaritmik bir ajandır. Amiodaron'un yarı ömrü 52.6 ± 23.7 gün, metaboliti olan desetilamiodaronun yarı ömrü ise 61.2 ± 31.2 gündür. Bu nedenle Amiodaron tedavisi kesildikten sonra da etkileri devam etmektedir. Amiodaron formülü: 2-bütül-3-benzofuranyl 4 - [2 - (diethylamino)-etoksi] -3,5-diiodophenyl keton hidroklorür olan bir benzofuran türevidir. Yapısal formül şekil 2-4'de verilmiştir.

Şekil 2.4 Amiodaron HCl'ün yapısal formülü ($C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$)



Beyaz krem renginde kristal toz özelliğinde olan bu ajan, suda kısmen, alkolde direkt çözünürken, kloroformda serbestçe çözünür (51-55).

İlk olarak hayvanlarda yapılan çalışmalarda, deneysel aritmilerin bastırılması ve önlenmesinde etkili olarak bulunmuştur. Bu etki iki temel özelliğe bağlanmıştır;

- 1) Miyokard hücre aksiyon potansiyeli, süresi ve refrakter dönemi uzatması,
- 2) Nonkompetitif α -ve β -adrenerjik inhibisyon oluşturmaktadır.

Amiodaron, tüm kalp liflerinin aksiyon potansiyeli süresini uzatırken, dV / dt oranında (aksiyon potansiyeli maksimum pik vuruş hızı) minimal azalmaya yol açar. Kardiyak dokularda refrakter dönem uzar. İstirahat membran potansiyelini etkilemeden (genel olarak otomatisteyi azaltarak otomatik hücrelerin dışında prepotential eğim azalır) genellikle otomatisteyi azaltarak

kalpte refrakter dönem artırır. Bu elektrofizyolojik etkiler % 15 - 20'lik bir azalma ile sinüs hızında, yaklaşık % 10 oranında uzama ile PR ve QT aralıklarına, U dalgaları gelişimine ve T-dalgası kontur değişikliklerine yansıtılır. Farmakolojik olarak kanıtlanmış belirgin sinüs bradikardisi ve kalp bloğuna neden olmasına rağmen, bu değişiklikler yalnız başına Amiodaron'un kesilmesini gerektirmez. Ancak nadir durumlarda QT uzaması yaparak aritminin kötüleşmesine neden olabilir. Bu durum Torsades de Pointes (kendi kendini sonlandırabilen ya da ventrikül fibrilasyonuna dönüşebilen bir polimorf ventrikül taşikardisi) habercisi olabilir. Amiodaron odakların baskılanması ile %2-4 oranında semptomatik bradikardi veya sinüs arrestine neden olabilir (55-59).

Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında Amiodaron'un intravenöz uygulamadan sonra damar düz kas relaksasyonu, periferik damar direncinde (afterload) azalma ve hafif kardiyak indekste artış oluşturduğu gösterilmiştir. Ancak Amiodaronun oral uygulanmasından sonra depresif sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonuna (LVEF) sahip hastalarda bile, LVEF'de anlamlı bir değişikliğe neden olmaz. Amiodaron'un insanda akut intravenöz kullanımından sonra hafif bir negatif inotropik etkisi olabilir (60-63).

Oral Amiodaron kullanımından sonra yavaş ve değişken şekilde emilir. Amiodaron'un biyoyararlanımı yaklaşık %50'dir, ancak çeşitli çalışmalarda %35 - 65 arasında değiştiği bildirilmiştir. Tek doz uygulamalarında maksimum plazma konsantrasyonlarına 3 - 7 saat sonra ulaşır. Kronik kullanımda yaklaşık her 100 mg / günlük doz, ortalama konsantrasyonda 0,5 mg / L artışa neden olur. Ancak bu ölçüler bireysel değişkenlikler gösterir. Gıdalar, genellikle Amiodaron emilim oranı ve miktarını artırır. Ayrıca plazma konsantrasyonu pik süresi (Tmax) % 37 azalır. Amiodaron, özellikle yağ dokusu, karaciğer, akciğer ve dalak gibi son derece iyi perfüze organlarda fazlaca birikmesi nedeniyle, büyük ve değişken bir hacim dağılımına (ortalama 60 L/kg) sahiptir. Amiodaron ana metabolitlerinden biri olan

desetilamiodaron (DEA) insanda tespit edilmiştir. DEA büyük bir ölçüde ve hemen hemen tüm dokularda birikir. İnsanlarda DEA aktivitesi için henüz bir veri bulunmamakla birlikte, hayvan çalışmalarında antiaritmik etkilerinin Amiodaron'a benzediği gösterilmiştir. İnsanlarda ise maksimum sınıf III antiaritmik etkinin oluşturulmasının zamanla DEA birikimi sayesinde olduğu düşünülmektedir (63-68).

Amiodaron DEA'a sitokrom P450 (CYP450) enzim grubu tarafından metabolize edilir. Özellikle hem karaciğer ve hem de barsakta bulunan sitokrom P450 3A4 (CYP3A4) ve CYP2C8. CYP3A4 izoenzimleri metabolize edilmesinde etkindir.

Amiodaron, defibrilasyon ve adrenaline cevap vermeyen nabızsız ventriküler taşikardi (VT) ve fibrilasyon (VF) (sınıf IIb), vagal manevra, adenozin ve atrioventriküler nodal blokaja cevap vermeyen reentry mekanizmalı (supraventriküler taşikardi) dar kompleks taşikardiler (sınıf IIb), normal QT intervali olan polimorfik VT'ler, hemodinamik olarak stabil VT'ler ve orjini belirsiz kompleks taşikardiler (sınıf IIb), hızlı ventrikül cevaplı atriyal aritmilerde (sınıf IIb) endikedir. Bu endikasyonlar tehlikeli yan etkiler nedeniyle sınıf IIb olarak kalmakta ve daha çok genişletilememektedir. İlaç hipersensitivitesi, kardiyojenik şok, ağır sinüs düğümü disfonksiyonu, belirgin sinüs bradikardisi, ikinci ya da üçüncü derece atriyoventriküler bloklar ve senkopa neden olan bradikardi (kalp pili ile birlikte kullanıldığı durumlar hariç) hallerinde kontrendikedir. Ayrıca QT süresini uzatan ilaçlarla, hipotansiyon ve bradikardi durumlarında, pulmoner ve hepatik toksisitede, sınıf I antiaritmiklerle (durum torsades de pointesi tetikleyebilir) birlikte kullanılması klinik tabloyu ağırlaştırabilir (68-70).

Yan etkiler;

- Pulmoner Toksikite; Oral veya intravenöz Amiodaron başlangıç tedavisi sonrası gün veya haftalar içerisinde gözlenebilen bir tablodur. Direkt akciğer grafisinde infiltrasyon veya kitle görüntüsü izlenirken, klinik olarak pulmoner

alveoler hemoraji, bronkospazm, hırıltılı nefes alma, ateş, nefes darlığı, öksürük, hemoptizi ve hipoksi gözlenebilir.

Hipersensitivite pnömonisi veya interstisiyel alveoler pnömonitis olarak ortaya çıkan bu olay immun bir reaksiyon olarak tanımlanır ve bronkoalveoler lavajda CD-8 pozitif lenfositler izlenebilir. Direkt fibrozis veya indirekt toksisitenin bir sonucu olarak bildirilen bu tabloların tedavisinde temel olarak Amiodaron mutlak kesilmelidir. Ayrıca steroid ve bronkodilatör tedaviler uygulanmalıdır (59-62).

- Aritminin daha da bozulması; Torsades de pointes gibi etkiler ortaya çıkabilir. Bradiaritmilerde yukarıda anlatıldığı gibi dikkatli kullanılmalıdır (70,72)

- Tirotoksikoz; Amiodaron kaynaklı hipertiroidizm tirotoksikoz ve / veya aritminin şiddetlenmesine neden olabilir. Bu konuda birçok çalışma mevcuttur. Yapılan çalışmalarda bu etkinin bir hipersensitivite etkisi olduğu bildirilmiştir. Hatta tiroidektomi gerektiğini belirten yayınlar mevcuttur (55,71,72).

- Karaciğer enzim yükseliği; Amiodaron kullanan hastalarda sıkça oluşabilen bu durum genellikle asemptomatiktir. Özellikle alkolik hepatit ve siroz gibi durumlarda dikkatli kullanılmalıdır (72).

- Görme bozukluğu; Altı ay ve daha uzun süreyle Amiodaron kullanmakta olan bireylerin birçoğunda korneal mikro-depositler (Corneal verticillata, vorteks keratopati olarak da bilinir) izlenir. Bunun sebebi ile lakrimal bezler tarafından salgılanan Amiodaron'un, kornea epitel tarafından emilerek kornea üzerinde birikmesidir. Genellikle herhangi bir semptomu neden olmaz. Amiodaron ile tedavi edilen hastaların bir kısmında ise görme bozukluğu, optik nöropati ve / veya optik nörit olguları bildirilmiştir. Bazı durumlarda, görme bozukluğu, kalıcı körlüğe ilerlediği bildirilmiştir. Görme

problemleri düşünülürken hızlı bir değerlendirme ile ilaç kesilmelidir (65,72).

2.4. Bevasizumab

Solid tümörlerin varlığını sürdürebilmesi, büyümesi, invazyon ve metastaz yapmasındaki öneminden dolayı, anjiyogenezin inhibe edilmesine yönelik tedaviler, tümör tedavisinde gittikçe artan bir biçimde yer almaktadır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar içerisinde en çok tercih edilenleri VEGF ve VEGF reseptörleri inhibitörleridir, bunlar VEGF'ye ve VEGF reseptörlerine bağlanan monoklonal antikordur (73). Bevasizumab rekombinant humanize edilmiş monoklonal bir IgG1 antikordur ve VEGF'nin nonspesifik bir inhibitörüdür.

Anjiyogenik faktörler arasında endotelial hücre mitojenlerinin en potent ve spesifik olanı VEGF'dir (74, 75). VEGF, greft edilmiş ve doğal olarak oluşmuş tümörlerce en çok üretilen, damar endotel hücrelerine özgü, homodimerik glikoprotein yapısında, 45 kiloDalton (kDa) büyüklüğünde heparin-bağlayıcı bir büyüme faktörüdür (76). VEGF, anjiyogenez ve lenfanjiyogenezini stimüle eder ve vasküler permeabiliteyi artırır (77). Ayrıca, endotel hücrelerinin migrasyonunu stimüle eder. MMP'lar ile uPA ve tPA salınımını uyararak hücre dışı matriks yıkımına yol açar. Bu durum tümör invazyon ve metastazına neden olur (78). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve farklılaşmasını sağlar (79). VEGF ile uyarım sonucu oluşan NO, endotel hücre migrasyonunda rol alır (80, 81).

VEGF, yedi üyeden oluşan bir büyüme faktörü ailesini temsil eder: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, PlGF-1 ve PlGF-2 (8, 82). Bu faktörlerin VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır.

-VEGF-A; Genellikle yalnızca VEGF olarak ifade edilir. VEGF-A, 43-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir (83, 84). Anjiyogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür, patolojik anjiyogenezde de rol oynar. Ayrıca hipoksi ile aktive olduğu gösterilmiş tek VEGF üyesidir. Bu nedenle anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerine yoğunlaşmaktadır (85). VEGF-A'nın içerdikleri aminoasit sayısına göre adlandırılan üç ana izoformu mevcuttur. Bunlardan VEGF₁₂₁ ve VEGF₁₆₅ dolaşımda bulunan asıl formlardır. Üçüncüsü ise VEGF₁₄₅ formudur (86-88).

-VEGF-B; Endotel hücre fonksiyonunu düzenler. Hücre dışı matriks yıkımı, hücre adezyonu ve göçünde rol oynar. Kalp, iskelet kası ve pankreasta fazla miktarda bulunur (89).

-VEGF-C ve VEGF-D; Lenfanjiyogenezi düzenlerler (90). VEGF-C aynı zamanda yara iyileşmesi üzerine etki eder (85).

-VEGF-E ve VEGF-F; VEGF-A'nın insan dışı canlılardaki homologlarıdır (91).

-PlGF-1 ve 2; Hematopoetik kök hücre toplanması için gereklidir (92). Endotel hücrelerinde en çok bulunan VEGF üyesi olan PlGF, VEGF-A'ya bağlı endotel hücre çoğalmasını uyarır (85, 93).

VEGF ailesi üyeleri VEGF reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Bu reseptörler ilk kez endotel hücreleri üzerinde saptanmışlardır (89). Endotel hücrelerinde transmembran proteini olarak bulunan bu reseptörlerin VEGF eksprese eden hücrelerle yakın komşuluk içerisinde olmaları, VEGF'nin jukstakrin/parakrin sinyal yolağıyla fonksiyon gösterdiğine işaret etmektedir (3). VEGF reseptörleri; VEGF reseptör 1 (VEGFR-1, Flt-1 ya da fms-benzeri tirozin kinaz-1), VEGF reseptör 2 (VEGFR-2, Flk-1/KDR ya da fetal liver kinaz-1/ kinase domain region), VEGF reseptör 3 (VEGFR-3, Flt-4, fms-like tyrosine kinase 4), nörofilin-1 ve nörofilin-2 reseptörleridir (89, 94-96).

VEGFR-1'in pozitif ve negatif anjiyogenik etkisi vardır (97). Endotel hücreleri, makrofajlar, monositler, hematopoetik kök hücreleri, damar düz kas hücreleri, perisitler, osteoblastlar ve kolorektal tümör hücrelerinde bulunur (89). VEGFR-2, VEGF-A'nın anjiyogenik, mitojenik ve vasküler permeabilite artışı etkilerinden sorumludur. VEGFR-2, endotel hücre büyümesi, farklılaşması ve göçünü düzenler (97). VEGFR-2, endotel hücrelerinde, megakaryositlerde, hematopoetik kök hücrelerde, damar düz kas hücrelerinde, retina öncesi hücrelerde ve bazı tümör hücrelerinde (küçük hücreli olmayan akciğer tümörleri, nöroblastom, meme ve mide kanserlerinde) bulunur (89). VEGFR-3, primer olarak lenfatik damarlardaki anjiyogenik etki ile ilişkilidir (93, 98, 99). Nörofilin-1, VEGF₁₆₅'in VEGFR-2'ye ilgisini artırma işlevinde bulunur (91). VEGFR-3, endotel hücrelerinde, nöronlarda ve aynı zamanda tümör hücrelerinde bulunur (89, 100). Nörofilin-2, VEGF₁₆₅, VEGF₁₄₅ ve PlGF'yi bağlar (89). VEGF-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye, VEGF-B, VEGFR-1'e, VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye, PlGF ise VEGFR-1'e bağlanır.

VEGF düzeyi, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER-2), RAS, SRC onkogenleri, p53 gen mutasyonu, PDGF, TGF- β , insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), TNF- α , interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10), interlökin-13 (IL-13), hipofiz hormonları ve nitrik oksit (NO) gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmektedir (76, 91, 101). Salınımı oksidatif stres ile artan hipoksiyle uyarılabilir transkripsiyon faktörü-1 (HIF-1) de VEGF salınımına yol açar (74, 75, 101,102).

Bevasizumab insan IgG1 iskeleti (% 93) ve fare VEGF-bağlayan tamamlayıcı-belirleyici bölgeler içerir (% 7). Bu bölgeler VEGF-A izoformlarının endotel hücre yüzeyinde yer alan reseptörlere (VEFR-1) bağlanmasını engelleyerek VEGF'nin biyolojik aktivitelerini inhibe eder. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk antianjiyogenik ajan olan Bevasizumab'ın, faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF

seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır (103). Faz III randomize çalışmalarda Bevasizumab'ın ilerlemiş kolorektal kanserler, meme kanserleri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kemoterapi ile kombine edildiğinde, yalnızca kemoterapiyle karşılaştırıldığında terapötik yarar sağladığı gösterilmiştir (103-107). Kolorektal kanserli hastalarda 5-florourasil, lökoverin ve oksaliptatin tedavisine eklendiğinde sağ kalımı artırdığının gösterilmiş olmasından sonra, 2006 yılında Bevasizumab'ın metastatik kolon ve rektum kanseri tedavisinde kullanımı onaylanmıştır. İleri evre metastatik meme kanserinin tedavisinde de kemoterapiye ek olarak kullanılmaya başlanan ilacın renal hücreli karsinom, pankreas kanseri, over kanseri ve hormona yanıt vermeyen prostat kanserinde klinik etkinliğine dair çalışmalar devam etmektedir (107). Bevasizumab, genel olarak güvenli kabul edilen bir ilaç olup, kombine edildiği kemoterapötik ilaçların yan etkilerinde ciddi bir artışa neden olmaz. Bevasizumab'ın en sık bildirilen yan etkileri proteinüri, hipertansiyon, tromboz, kanama eğilimi ve yara iyileşmesinde gecikmedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Pelletlerin Hazırlanması

Anjiyogenez üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere çalışmamızda sınıf III antiaritmik olan Amiodaron (Cordarone® 150 mg amp, SANOFI - SYNTHELABO İLAÇ A.Ş®, İstanbul) ve bir VEGF monoklonal antikoru olan Bevasizumab (Altuzan® 400 mg/16 ml flakon, Roche Müstahzarları Sanayi Anonim Şirketi®, İstanbul) kullanıldı. Amiodaron ve Bevasizumab'ın kendi sunum formu çözünmüş infüzyon solüsyonu şeklindeydi. İlaçların uygulamasında üç değişik konsantrasyon (10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M) kullanıldı. Bu konsantrasyonlar ön çalışmalarda denenen değişik konsantrasyonlarda elde edilen submaksimal etki sağlayan konsantrasyonu (10^{-4} M) ve klinikte reçete edilen ilaçların vücutta ulaşmış oldukları etkin konsantrasyon olan 10^{-6} M konsantrasyonu da içermesi bakımından tercih edildi. İlaçların önce 10^{-4} M konsantrasyonları hazırlandı. Daha dilüe konsantrasyonlar 10^{-4} M'lık stok solüsyonun seyreltilmesi ile elde edildi. Diskin 10 µL'lik final hacminde 10^{-4} M'lık ilaç konsantrasyonunu sağlayacak ilaç miktarını bulabilmek için klasik molarite formülü kullanıldı ($M=m/V$). Her çalışma setinde kayıplar da göz önüne alınarak yaklaşık olarak 90 disk hazırlanarak uygulandı. Bu nedenle, her ilaç için yaklaşık 1 mL'lik agar ve ilaç karışımı hazırlandı ($10 \mu\text{L} \times 100 = 1\text{mL}$).

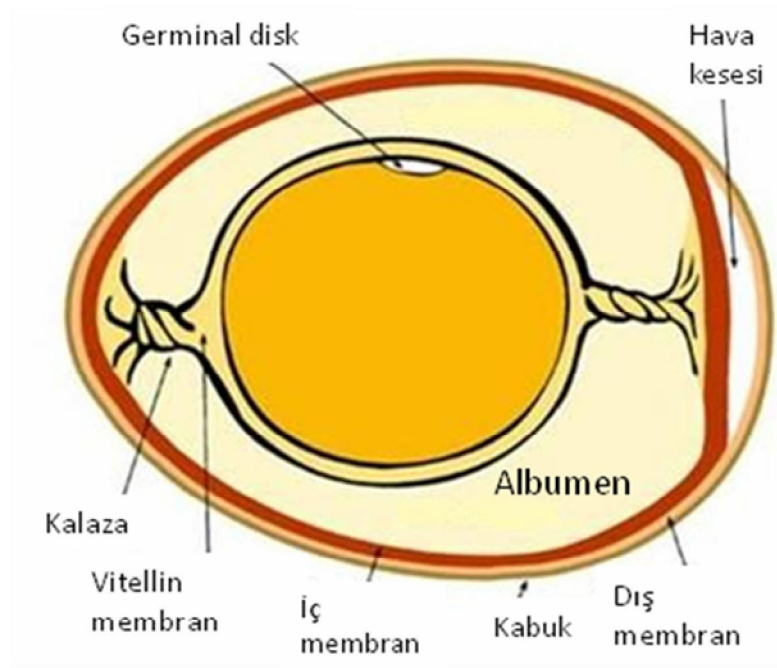
Kolay uygulama için, solüsyonların pelletleri 5 mm çaplı sirküler paslanmaz çelik yüzeyde 10 µL'lik damlalar şeklinde hazırlanmış ve hızla oda ısısına bırakılarak katılaştırıldı.

3.2. KAM Deneyi

Ross 308 cinsi döllenmiş tavuk yumurtaları Yemsel Tavukçuluk Hayvancılık Yem Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden (Kayseri)

edinildi. Çalışmamız için Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurul'undan 04.08.2011 tarihli ve 62 sayılı etik kurul onayı alındı.

Döllenmiş tavuk yumurtaları 37,5 °C'de %80 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda kuluçkaya yerleştirildi (Şekil 3.1 ve 3.2). Kuluçkanın beşinci gününde yumurtanın künt tarafından enjektör yardımıyla 5-10 ml albumin alındı ve yumurtanın diğer ucundan 2-3 cm çapında kabuk kesilerek çıkarıldı. Kabuktaki bu açıklık laboratuvar filmi ile kapatılarak 72 saat daha inkübe edildi (Şekil 3.3). KAM yaklaşık 2 cm çapa ulaştığında her bir yumurtaya bir pellet olacak şekilde koriyoallantoyik membran üzerine etken madde içeren pelletler yerleştirildi (Şekil 3.4). İlaç uygulamasından sonra 24 saatlik ek inkübasyon süresi tanındı. Stereoskopik mikroskop altında Bürgermeister ve ark.nın (108) skortlama sistemi (Tablo 3.1) kullanılarak pellet uygulama bölgesindeki damar yapısı değerlendirildi (Şekil3.5).



Şekil 3.1. Döllenmiş tavuk yumurtasının şematik gösterimi.

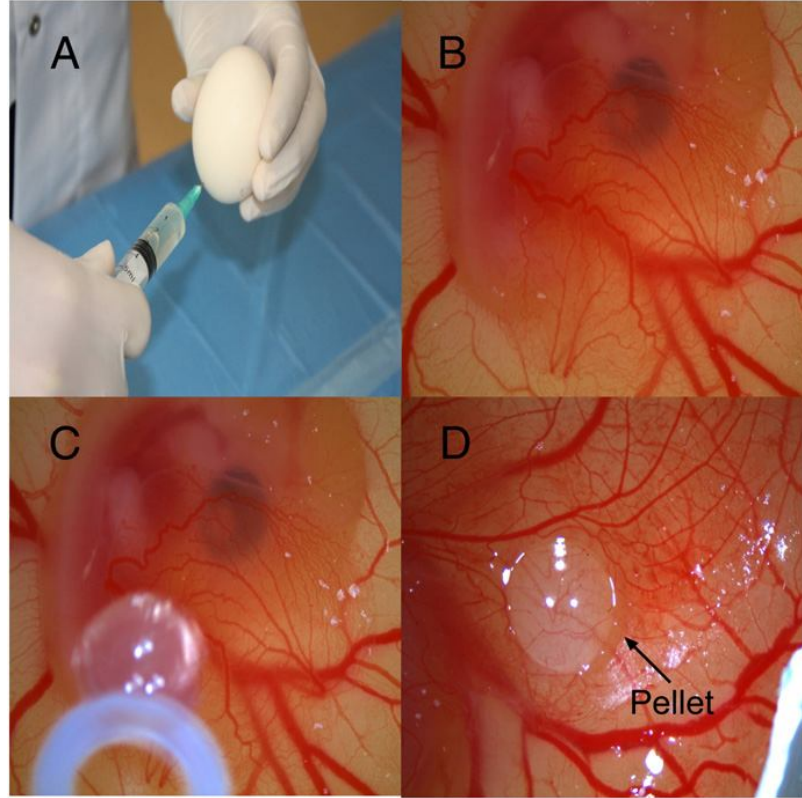


Şekil 3.2. Döllenmiş tavuk yumurtalarının silinerek kuluçkaya alınması.



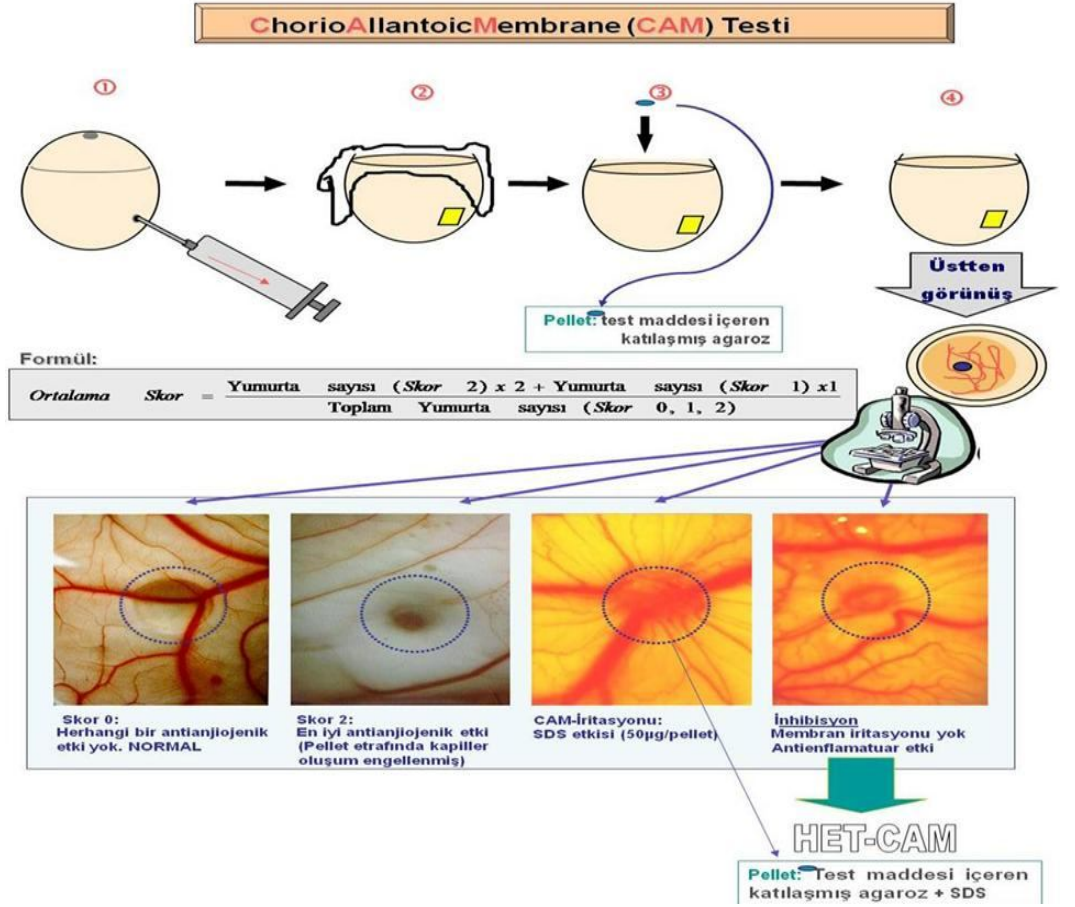
Şekil 3.3. Kuluçkanın 5. gününde yumurtaların açılması (Doç. Dr. Zübeyde Akın Polat'ın izniyle, Cumhuriyet Üniversitesi CÜTFAM Laboratuvarı'nda görüntülendi).

Şekil 3.4. KAM modelinde Amiodaron çalışılması aşamaları



A. Albüminin enjektör ile çekilmesi. B. Yumurtada açılan bir pencere ile koriyoallantoyik membrandaki (KAM) anjiyogenezin değerlendirilmesi ($\times 8$). C. Pelletin KAM a yerleştirilmesi ($\times 8$). D. İlaçla KAM daki anjiyogenezin inhibisyonu (skor): 0.5) ($\times 8$).

Şekil 3.5. Koryoallantoyik membran modeli.



Tablo 3.1. Koriyoallantoyik membran üzerinde anjiyogenik etkinin değerlendirilmesi için kullanılan skor değerleri.

| Skorlama | Etki | İzlenim/Açıklama |
|----------|----------|--|
| 0 | Yok | Normal embriyo oluşumu, çevre kapillerlere göre değişiklik yok |
| 0,5 | Zayıf | Kapiller damarsız alan yok. Kapillerlerin yoğunluğu azalmış ancak pelletten çok daha geniş değil. |
| 1 | Orta | Kapillersiz alan az veya kapiller yoğunluk belirli bir alanda azalmış. Etkiler pellet alanının 2 katından fazla değil. |
| 2 | Kuvvetli | Pelletin etrafında en az iki kat mesafe olacak şekilde kapillersiz alan mevcut. |

Her bir test bileşimi için en az 20 yumurtaya uygulama yapılmıştır. Her deney grubu için sadece agar içeren pelletlerin uygulandığı kontrol yumurtaları da değerlendirmeye alındı. Tüm testlerin sonuçları iki kez değerlendirildi. Sonuç olarak toplam 143 uygulama değerlendirmeye alındı. İlaç gruplarına göre yapılan uygulama sayısı Tablo 3.2'de gösterildi.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan ilaç gruplarında uygulama sayısı.

| | 10 ⁻⁴ M | 10 ⁻⁵ M | 10 ⁻⁶ M |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Amiodaron | 20 | 20 | 20 |
| Bevasizumab | 24 | 29 | 30 |
| Toplam | 143 | | |

Uygulama sonrası koriyoallantoyik membran (KAM) dışına çıkan ve irritasyon gözlenen yumurtalar değerlendirme dışı bırakılmıştır.

KAM üzerinde kullanılan etken maddelerin değerlendirilmesi için Bürgermeister ve ark. tarafından geliştirilen ortalama skorlama sistemi kullanıldı (108). Ortalama skorun belirlenmesi için kullanılan denklem şudur:

$$\text{Ortalama skor} = \frac{\text{Yumurta sayısı (Skor 2)} \times 2 + \text{Yumurta sayısı (Skor 1)} \times 1}{\text{Toplam Yumurta Sayısı (Skor 0, 1, 2)}}$$

Bu ortalama skor sistemine göre;

Skor < 0,5: antianjiyogenik etki yok,

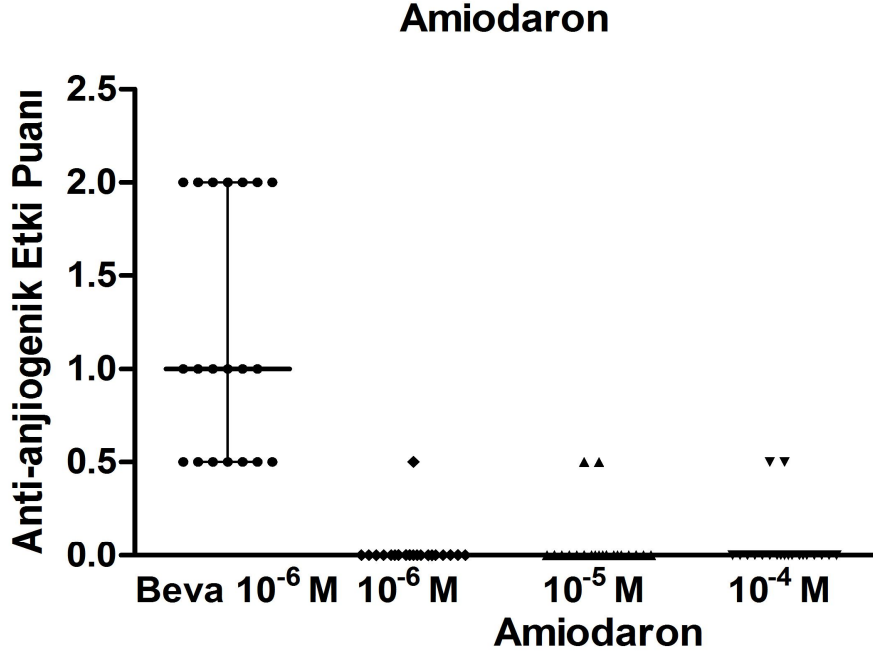
Skor 0,5-1: zayıf düzeyde antianjiyogenik etki,

Skor > 1: güçlü antianjiyogenik etki olarak değerlendirilmektedir.

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler n (%) ve ortanca-%25-75 interkuartil aralık olarak ifade edildi. Kolmogorov-Smirnov testi ile normal dağılıma uymayan verilerin analizi için Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı. Çalışmanın sonuçlarına göre power analiz yapıldı.

BULGULAR



Şekil 4.1. Bevasizumab 10^{-6} M, Amiodaron 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları. Veriler skatter grafikte ortanca (interkuartil %25-75 aralık) olarak sunulmuştur. (Beva:Bevasizumab)

Şekil 4.1'de Amiodaron 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları gösterildi. Skatter grafikte de işaretlendiği gibi Amiodaron konsantrasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki anlamlı farklılıklar saptandı.

Amiodaron 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanının, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulundu.

Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde Amiodaron'un yüksek konsantrasyonda (10^{-4} M) daha belirgin antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu gösterdi (Tablo 4.1). Ancak düşük dozlarda bu etki sadece 10^{-5} M dozlarda 2 yumurtada 0,5 skorda, 10^{-6} M dozlarda 1 yumurtada 0,5 skorda izlenmiş olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.1 Amiodaron'un farklı dozlarda angjiyogenik skorlaması

| Skor | 0 | 0,5 | 1 | standart sapma \pm deviasyon |
|-------------------|----|-----|---|--------------------------------|
| 10^{-4} M n(20) | 17 | 2 | 1 | 0,52 \pm 0,2* |
| 10^{-5} M n(20) | 18 | 2 | - | 0,05 \pm 0,15 |
| 10^{-6} M n(20) | 19 | 1 | - | 0,025 \pm 0,11 |

* $p<0,05$

Bevasizumab'ın 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanları gösterilmiştir. Skatter grafikte de işaretlendiği gibi Bevasizumab konsantrasyonlarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda aşağıdaki anlamlı farklılıklar saptanmıştır.

Bevasizumab'ın 10^{-4} M ve 10^{-5} M konsantrasyonlarda antianjiyogenik etki puanının 10^{-6} M konsantrasyondan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu [1 (1-2) ve 1 (1-2)'ye karşılık 0 (1-1), sırasıyla; $p<0,05$] bulundu. Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde Bevasizumab'ın yüksek konsantrasyonlarda belirgin olmak üzere antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bevasizumab'ın 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonları için antianjiyogenik ortalama skor değerleri sırasıyla 1,58; 1,55 ve 1,16 olarak bulundu.

Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlara göre α ;0,01, β ;0,10 ve $1-\beta$;0,90 olarak alındığında çalışmanın gücü $p=0,90940$ olarak saptandı.

TARTIŞMA

Anjiyogenez embriyonal gelişme, menstrüel siklus, yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik olayda rol alan ve proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörlerle sıkı bir biçimde kontrol edilen bir süreçtir (109, 110). Erişkin insanlardaki vasküler endotelial hücreler tipik olarak düşük yarılanma ömrü hızında olmalarına rağmen, yaşamları boyunca yeni kan damarları oluşturacak çoğalma kapasitesine sahiptirler. Bu süreç, embriyonik gelişim, normal doku büyümesi, yara iyileşmesi, miyokardiyal iskemi, gözdeki neovasküler hastalıklar, Von-Hippel-Lindau Hastalığı (retinal veya SSS hemanjioblastomuna dair aile hikayesi varlığı ile birlikte renal tümörler, pankreatik kist veya tümörler, feokromasitoma, epididimin papiller kistadenomu varlığı), Herediter Hemorajik Telenjektazi gibi genetik hastalıklar, romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıklar ve kadınlarda üreme döngüsü (ovülasyon, menstrüasyon ve plasenta gelişimi) içinde olduğu gibi malign tümörlerin büyüme ve metastatik yayılımlarında da yer almaktadır (111-113). Yukarıda da belirtildiği gibi miyokard perfüzyon defektleri açısından kritik bir bölge olması nedeniyle, perfüzyon defektleri durumunda anjiyogenezise ihtiyaç duyabilen bir dokudur. Akut miyokard infarktüsündeki modern reperfüzyon tedavilerine rağmen, infarktüs sonrası infarkt bölgesi ve sol ventrikül kavitesi genişleyerek, kalp yetersizliği ortaya çıktığında önemli bir problem oluşturmaktadır. Kronik iskemi de ise anjiyogenez sayesinde gelişmiş kollaterallerin varlığı nedeniyle akut olaylar daha az dramatiktir. Bu nedenle canlı dokuyu korumak esas alınmalıdır. Bunun için kök hücre uygulamaları gibi yeni canlı doku sağlamaya yönelik çalışmalarda yapılmaktadır. Ancak reperfüzyon olmadan önceki kollateral dolaşım en az reperfüzyon kadar önemlidir. Hatta yapılan kök hücre çalışmalarında bile akinetik dokuda elde edilen minimal kasılmaların dahi yeniden anjiogenezi aktive ettiği bildirilmiştir (114-116). Unger ve arkadaşları hayvan modelinde, ekstrakardiyak bir arteri iskemik bölgeye

yerleştirerek sol ön inen koroner arter ile aralarında anjiyogenez yoluyla anastomoz oluşturduklarını bildirmişlerdir. Bu modelle, bölgesel iskeminin kollateral proliferasyonu için gerekli olduğunu göstermişlerdir (116). Zamanla anjiogenezin önemi ortaya konulduğça tedaviye yönelik anjiyogenez çalışmaları hız kazanarak, mevcut anjiyogenezin korunması daha da önemli hale gelmiştir (117).

İskemi, miyokard fonksiyon kaybı ve aritmi oluşmasında önemli bir etkidir. Bunun nedeni gap junctionların (epitel, kas ve sinir hücrelerindeki yan yüzey farklılaşma bölgeleri) ve hücrel elektrik iletiminin bozulması olduğu bildirilmiştir. Canlılığını koruyabilen hücreler kısmen bu iletimini sürdürebilmektedir. Ventriküler fibrilasyonda dahil olmak üzere, aritmilerin bimodal frekans dağılımı büyük bir koroner arterin ani ve büyük bir tıkanma sonrasında oluşur. Atrial fibrilasyon gibi aritmilerin perfüzyondan nasıl etkilendiği net olarak bilinmemekle birlikte, miyokardın perfüzyona ihtiyacı aşıkârdır (118-120). Mevcut kollateral varlığı ve yeni gelişecek olan dolaşım sistemi hücrelerin devamlılığı için önemlidir. Aksi takdirde fibröz ve iletim özelliğinden yoksun bir doku ile yenilenen kasılma ve iletim defektlerine açık bir kalp ortaya çıkacaktır. Bu açıdan çalışmamızda antianjiyogenez özelliği net olarak ortaya konmuş pozitif grup oluşturularak antiaritmik olarak sıkça kullanılan Amidaron'un hayati öneme sahip anjiyogenez üzerine etkileri karşılaştırıldı.

Bevasizumab ise VEGF'nin monoklonal antikorudur ve bazı kanser türlerinin tedavisinde kemoterapiyle kombine olarak uygulanması gittikçe artan bir biçimde kabul görmektedir. Lokal rekürren veya metastatik meme kanseri, skuamöz olmayan küçük hücreli dış akciğer kanseri, metastatik kolorektal kanser ve metastatik renal hücreli kanser tedavisinde kemoterapi ile birlikte uygulandığında sağ kalımı ve ilk tercih tedaviye yanıt oranını artırdığı saptanmıştır (121-122). VEGF ayrıca diyabetik retinopati ve yaşla ilişkili maküler dejenerasyona ikincil gelişen intraoküler

neovaskularizasyonda da rol oynamaktadır. Neovasküler yaşla ilişkili maküler dejenerasyon ve proliferatif diyabetik retinopatinin tedavisinde intravitreal Bevasizumab uygulamasının yararlı olduğu belirlenmiştir (121, 122). Bu bulgular, Bevasizumab'ın in vivo potent antianjiyogenik etkisi ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda pozitif kontrol grubunda Bevasizumab kullanılmıştır. Çalışmamızda, $10^{-4}M$, $10^{-5}M$ ve $10^{-6}M$ konsantrasyonlarda Bevasizumab'ın ortalama antianjiyogenik skorunun 1'in üzerinde olduğu, yani güçlü antianjiyogenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, ilacın yüksek konsantrasyonlar olan $10^{-4}M$ ve $10^{-5}M$ konsantrasyonlarda daha fazla antianjiyogenik etkide bulunduğu belirlenmiştir.

Amiodaron, supraventriküler ve ventriküler aritmilerin tedavisinde başarı ile kullanılan sınıf III antiaritmik ilaçtır. Koroner baypas operasyonları öncesi profilaktik kullanımı postoperatif aritmi sıklığını azaltmakla birlikte, anestezi ilaçları ile yaptığı etkileşim neticesinde pulmoner ve hepatik disfonksiyon ve düşük kalp debisine neden olabildiği bildirilmektedir. Amiodaron negatif inotropik etkisi nedeni ile özellikle sol ventrikül disfonksiyonu olan hastalarda kalp yetmezliğine neden olduğu bilinmektedir. Amiodaron'un, koroner baypas operasyonlarından sonra kullanımı ise, anestezi ajanlarıyla etkileşmeden doğan sorunları azaltacağı bildirilmiştir (55,56,57,58,123). You ve arkadaşlarının çalışmasında global iskemide miyokardın 3 katmanında da transmural dispersiyon (dağılım) repolarizasyonunun arttığı ve bunun ventriküler aritmilerle yakından ilişkili olduğu belirtilmiş ve Amiodaron'un bu repolarizasyonu azalttığı bildirilmiştir (124). Nagasawa ve arkadaşları yaptıkları çalışmada oral Amiodaron yükleme dozunun koroner arter ligasyonu / reperfüzyon ile uyarılan aritmileri baskılayabileceğini ancak bu doz yarının QT intervalini uzatmayacak oranlarda ayarlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Amiodaron'un bu özelliğinin de diğer sınıf III antiaritmik ajanlardan farklı olduğunu bildirmişlerdir (125). Bir başka güncel konuda Amiodaron'un

antioksidan ve vazodilatör etkileridir. Bu konuda yapılan çalışmalarda Amiodaron'un bu etkileri sayesinde endotel koruyucu etki sağlayabileceği iddia edilmiştir. Traupe ve arkadaşlarının farelerde yaptıkları cinsiyet tabanlı organ perfüzyon model çalışmalarında amidaron'un etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın verilerine göre cinsiyetten bağımsız olarak Amiodaron hızla aterosklerotik damar dokusunda birikerek, damar otoritmitisitesini engellediğini ve arteriosklerotik arterlerde endotel bağımlı fonksiyonu iyileştirdiğini göstermişlerdir (126). Bu veriler, Amiodaron'un antiaritmik etkileri dışında antioksidan ve vazodilatör etkilerinin incelenerek uygun şartlarda iskemi reperfüzyon sonrası kollateral dolaşıma katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda da Amiodaron'un anjiogenez üzerine etkileri araştırılarak ileride etki mekanizmalarına yönelik yapılacak çalışmalara ışık tutulması hedeflendi. Verilerimize göre Amiodaron'un 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanının, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu [0 (1-1)' e karşılık 0,5 (0,5-1,0) ve 0,5 (0,5-1,0), sırasıyla; $p < 0,05$] bulundu. Bulgularımız, kullandığımız araştırma modelinde Amiodaron'un yüksek konsantrasyonda (10^{-4} M) belirgin olmak üzere antianjiyogenik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Ancak düşük dozlarda bu etki sadece 10^{-5} M dozlarda 2 yumurtada 0,5 puanında, 10^{-6} M dozlarda 2 yumurtada 0,5 skorunda 1 yumurtada izlenmiş olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). 10^{-4} M konsantrasyonu genellikle ilaç uygulamaları için yüksek bir konsantrasyon olup genellikle insan dozlarının çok üzerinde bir rakamdır. Bu nedenle bu dozun araştırılması ancak *in vivo* modellerde mümkün olmaktadır. Amiodaron içinde 10^{-4} M konsantrasyonları insan dozlarının üzerindedir. Bu durum insanda kullanılan dozların antianjiyogenik etki göstermediği şeklinde yorumlanabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Doku perfüzyonunun devamı, hücresel canlılığın ve işlevselliğın korunması için anjiyogenez büyük önem kazanmaktadır. Özellikle iskemiye duyarlı miyokard gibi dokularda bu durum daha ön plana çıkmaktadır.

Tavuk embriyosu KAM modeli düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve hızlı sonuç veren bir yöntem olması nedeniyle ilaçların antianjiyogenik etkilerinin araştırılmasında gittikçe artan bir biçimde tercih edilmektedir.

Çalışmamızda;

1. Antianjiyogenik etkileri incelenen Amiodaron'un, bu yöntemle antianjiyogenik etkinliğı net olarak ortaya konmuş Bevasizumab ile karşılaştırılmasında net bir antianjiyogenik etki oluşturmadığı, ancak yüksek dozlarda bu etkinin anlamlı olabileceğı belirlendi.
2. Amiodaron'un 10^{-4} M konsantrasyonda antianjiyogenik etki puanınının, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlardan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğı [0 (1-1)' e karşılık 0,5 (0,5-1,0) ve 0,5 (0,5-1,0), sırasıyla; $p<0,05$] bulundu.
3. Amiodaron'un anjiyogenez üzerine etki mekanizması net olarak ortaya konamamakla birlikte modelimiz anjiyogenez inhibisyonunu gösterdiği için Amiodaron'un düşük dozlardaki pozitif etkisi ortaya konamamıştır. Yani anjiyogenik etkinliğı açıklanamadı.
4. Antianjiyogenik etkisi incelenmek istenen Amiodaron ve yeni moleküllerin etkilerinin araştırılması konusunda araştırma yöntemimizdeki gibi tavuk embriyosu KAM modelinin kullanılması ve etkilerinin Bevasizumab ile karşılaştırılarak test edilmesi iyi bir seçenek olabilir.
5. İskemik durumların neden olduğı aritmilerde kullanılacak ajanın seçiminde anjiyogenezin korunması klinik sonuçları iyileştirebilir. Bu

nedenle bu sınıf ilaçların anjiyogenik etkilerinin ortaya konması fayda sağlayacaktır.

6. Amiodaron geniş spektrumlu bir antiaritmik olarak, rutin dozlarda iskemi reperfüzyon aritmilerinde kullanılması anjiogeneze negatif etki oluşturmadığı için ek katkı sağlayabilir.

7. Bizim çalışmamızın aksine, Amiodaron'un pozitif etkilerini de ortaya konulması için anjiyogenez aktivasyonunu araştıran çalışmalar klinisyenlere, yeni bir bakış açısı sağlayacaktır.

Çalışmamızın sonuçları, antiaritmik tedavide anjiyogenezin korunması hedefleniyorsa, rutin dozlarda Amiodaron'un uygun bir seçim olabileceği kanaatindeyiz. Ancak yüksek dozlarda yaptığı antianjiyogenik etki nedeniyle yükleme dozu gibi durumlarda dikkatli kullanılmasını önermekteyiz. Ayrıca çalışmamızın, anjiyogenez üzerine pozitif etkilerin ortaya çıkarılması için yapılacak olan gelecek çalışmalara kaynak sağlayabileceğine inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6):653-660.
2. Folkman J ve Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235(4787):442-447.
3. Zimmerman MA, Selzman CH, Raeburn CD, Calkins CM, Barsness K, Harken AH. Clinical applications of cardiovascular angiogenesis. *J Card Surg.* 2001 Nov-Dec; 16(6):490-7.
4. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol.* 2000; 35(5):227-231.
5. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626):671-674.
6. Konukoğlu D ve Turhan MS. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2005; 36(1):42-48.
7. Varner JA. The role of vascular cell integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in angiogenesis. *EXS.* 1997; 79:361-390.
8. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9(6):669-676.
9. Asano Y, Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Increased expression levels of integrin alphavbeta5 on scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol.* 2004; 164(4):1275-1292.
10. Haubner R. Alphavbeta3-integrin imaging: a new approach to characterise angiogenesis? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(1):54-63.

11. Greenberg DA ve Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 2005; 438(7070):954-959.
12. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol*. 2005; 31(2):117-121.
13. Alitalo K ve Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002; 1(3):219-227.
14. Schneider M, Othman-Hassan K, Christ B, Wilting J. Lymphangioblasts in the avian wing bud. *Dev Dyn*. 1999 ;216(4-5):311-319.
15. Zachary I ve Morgan RD. Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease: biological context, challenges, prospects. *Heart*. 2011; 97(3):181-9.
16. Buyschaert I, Carmeliet P, Dewerchin M. Clinical and fundamental aspects of angiogenesis and anti-angiogenesis. *Acta Clin Belg*. 2007; 62(3):162-9.
17. Grote K, Salguero G, Ballmaier M, Dangers M, Drexler H, Schieffer B. The angiogenic factor CCN1 promotes adhesion and migration of circulating CD34+ progenitor cells: potential role in angiogenesis and endothelial regeneration. *Blood*. 2007; 110(3):877-85.
18. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*. 2004; 117:3-32.
19. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*. 2000; 50(1-2):1-15.
20. Schachtner SK, Wang Y, Scott Baldwin H. Qualitative and quantitative analysis of embryonic pulmonary vessel formation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22(2):157-65.

21. Atkins GB, Jain MK, Hamik A. Endothelial differentiation: molecular mechanisms of specification and heterogeneity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31(7):1476-84.
22. Robbins RM ve Beitel GJ. Vascular lumen formation: negativity will tear us apart. *Curr Biol.* 2010; 20(22):973-5.
23. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA. ve ark. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593–600.
24. Hibbert B, Chen YX, O'Brien ER. c-kit-immunopositive vascular progenitor cells populate human coronary in-stent restenosis but not primary atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287(2):H518-24.
25. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn.* 2004; 231(3):474-488.
26. Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumour angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(3):294-300.
27. Hristov M ve Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(4):498-508.
28. Loscalzo J ve Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995;3 8(2):87-104.
29. Miranda KM, Paolocci N, Katori T, Thomas DD, Ford E, Bartberger MD. ve ark. A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(16):9196-201.

30. Moncada S ve Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(1):193-201.
31. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C. ve ark. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998; 101(11):2567-78.
32. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO. ve ark. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(5):2604-9
33. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M. ve ark. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2004; 109(20):2454-61.
34. Moncada S ve Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; (176 Pt 1):213-54.
35. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A. ve ark. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 2004; 22(2):169-173.
36. Townsend CM, Beauchamp DR, Evers MB, Mattox KL (Eds). *Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice*. 17th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders; 2004.
37. Hunt TK. Wound Healing. In: Doherty GM (Eds). *Current Surgical Diagnosis and Treatment*, 12th ed. United States of America, McGraw Hill; 2006:75-88.

38. Waltenberger J. Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res.* 2001; 49(3):554-560.
39. Boodhwani M, Sodha NR, Mieno S, Xu SH, Feng J, Ramlawi B. ve ark. Functional, cellular, and molecular characterization of the angiogenic response to chronic myocardial ischemia in diabetes. *Circulation* 2007; 116(11):I31-I37.
40. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6):1615-1625.
41. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C, Cavallari V. ve ark. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 2002; 82(6):411-417.
42. Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M. ve ark. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 2001; 50(3):667-674.
43. Vallee BL, Riordan JF, Lobb RR, Higachi N, Fett JW, Crossley G. ve ark. Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia* 1985;41(1):1-15.
44. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther.* 1991; 51(1):1-11.
45. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec.* 2001; 264(4):317-324.

46. Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J Exp Zool.* 2002; 292(3):241-254.
47. Romanoff AL. *The avian embryo.* New York, Macmillan Co, 1960.
48. Hazel SJ. A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med.* 2003; 141(3):217-228.
49. Leng T, Miller JM, Bilbao KV, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina* 2004; 24(3):427-434.
50. Özgürtaş T. Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi* 2009; 51:67-69.
51. Holt DW, Tucker GT, Jackson PR, Storey GCA. Amiodarone pharmacokinetics. *Am Heart J* 1983; 106:843-7.
52. Vassallo P ve Trohman RG. Prescribing Amiodaron An Evidence-Based Review of Clinical Indications. *JAMA.* 2007;298(11):1312-1322.
53. Çiçekçioğlu F, Kervan Ü, Parlar Aİ, Ersoy Ö, Bardakçı H, Ulus AT. ve ark. Koroner baypas cerrahisinden sonra gelişen atriyal fibrilasyon tedavisinde Amiodaron'un etkinliği. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2009;17(2):77-82
54. Amiodarone - Compound Summary (CID 2157)
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2157>
55. Claxton S, Sinha SN, Donovan S, Greenaway TM, Hoffman L, Loughhead M. ve ark. Refractory amiodaron-associated thyrotoxicosis: an indication for thyroidectomy. *Aust N Z J Surg.* 2000; 70(3):174-8.

56. Piccini JP, Berger JS, O'Connor CM. Amiodaron for the prevention of sudden cardiac death: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J*. 2009; 30(10):1245-53.
57. Sim I, McDonald KM, Lavori PW, Norbutas CM, Hlatky MA. Quantitative overview of randomized trials of amiodaron to prevent sudden cardiac death. *Circulation*. 1997; 96(9):2823-9.
58. Zarembski DG, Nolan PE Jr, Slack MK, Caruso AC. Empiric long-term amiodaron prophylaxis following myocardial infarction. A meta-analysis. *Arch Intern Med*. 1993; 153(23):2661-7.
59. Ohar JA, Jackson F Jr, Redd RM, Evans GR, Bedrossian CW. Usefulness of serial pulmonary function testing as an indicator of amiodaron toxicity. *Am J Cardiol*. 1989; 64(19):1322-6.
60. Magro SA, Lawrence EC, Wheeler SH, Krafchek J, Lin HT, Wyndham CR. Amiodaron pulmonary toxicity: prospective evaluation of serial pulmonary function tests. *J Am Coll Cardiol*. 1988; 12(3):781-8.
61. Fraire AE, Guntupalli KK, Greenberg SD, Cartwright J Jr, Chasen MH. Amiodaron pulmonary toxicity: a multidisciplinary review of current status. *South Med J*. 1993; 86(1):67-77.
62. Bedrossian CW, Warren CJ, Ohar J, Bhan R. Amiodaron pulmonary toxicity: cytopathology, ultrastructure, and immunocytochemistry. *Ann Diagn Pathol*. 1997; 1(1):47-56.
63. Levy S. The value of oral amiodaron in the treatment of ventricular arrhythmias in heart disease. *Drugs*. 1991; 41(2):47-53.
64. Singh BN. Expanding indications for the use of Class III agents in patients at high risk for sudden death. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1995; 6(10 Pt 2):887-900.

65. Shaikh S, Shaikh N, Chun SH, Spin JM, Blumenkranz MS, Marmor MF. Retinal evaluation of patients on chronic amiodaron therapy. *Retina*. 2003; 23(3):354-9.
66. Van Herendael H, Dorian P. Amiodaron for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6:465-72.
67. Ramos G, Ramos Filho J, Pereira E, Gabriel Neto S, Chaves E. Peri-operative management of amiodaron patients. *Rev Bras Anesthesiol*. 2004; 54(4):573-81. [Article in Portuguese]
68. Zipes DP, Prystowsky EN, Heger JJ. Amiodaron: electrophysiologic actions, pharmacokinetics and clinical effects. *J Am Coll Cardiol*. 1984; 3(4):1059-71.
69. Sloskey GE. Amiodaron: a unique antiarrhythmic agent. *Clin Pharm*. 1983; 2(4):330-40.
68. Testa A, Ojetti V, Migneco A, Serra M, Ancona C, De Lorenzo A. Use of amiodaron in emergency. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2005; 9(3):183-90.
69. Cahoon W Jr, Flattery MP, Hess ML. Amiodaron: development, clinical indications, and safety. *Prog Cardiovasc Nurs*. 2007; 22(3):173-6.
70. Hein L. Amiodaron. *Dtsch Med Wochenschr*. 2001; 126(21):625-6. [Article in German]
71. Kurnik D, Loebstein R, Farfel Z, Ezra D, Halkin H, Olchovsky D. Complex drug-drug-disease interactions between amiodaron, warfarin, and the thyroid gland. *Medicine (Baltimore)*. 2004; 83(2):107-13.
72. Shukla R, Jowett NI, Thompson DR, Pohl JE. Side effects with amiodaron therapy. *Postgrad Med J*. 1994; 70(825):492-8.

73. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD. ve ark. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. *Eur J Cancer*. 2002; 38(3):1133-40.
74. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2005; 23(14):3243-3256.
75. Hicklin DJ ve Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*. 2005; 23(5):1011-1027.
76. Keshet E ve Ben-Sasson SA. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J Clin Invest*. 1999; 104(11):1497-1501.
77. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pockock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*. 2002; 200(6):581-597.
78. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997; 18(1):4-25.
79. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995; 146(5):1029-1039.
80. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol*. 2001; 2(3):149-156.
81. Van Buren G 2nd, Camp ER, Yang AD, Gray MJ, Fan F, Somcio R. ve ark. The role of nitric oxide in mediating tumour blood flow. *Expert Opin Ther Targets*. 2006; 10(5):689-701.

82. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991; 5(12):1806-14.
83. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002; 29(6):10-14.
84. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(10):795-803.
85. Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90(12):1542-1547.
86. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991; 47(3):211-218.
87. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC. et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991; 266(18):11947-11954.88.
88. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992; 13(1):18-32.
89. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005; 9(4):777-794.
90. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces

lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2002; 196(11):1497-1506.

91. Shams N ve Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmol Clin North Am.* 2006; 19(3):335-344.

92. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B. ve ark. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 2002; 8(8):841-849.

93. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol.* 2006; 142(4):660-668.

94. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004; 25(4):581-611.

95. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt5):853-865.

96. Ferrera N. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med.* 1993; 3:244-250.

97. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Exp Eye Res.* 2006; 83(5):1005-1016.

98. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D. ve ark. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(8):3566-3570.

99. Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol.* 2000; 156(5):1499-1504.

100. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(1):4-6.
101. Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis. Introduction. *Cancer Metastasis Rev.* 1990; 9(3):171-174.
102. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Antiangiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5(4):237-256.
103. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W. ve ark. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer *N Engl J Med.* 2004; 350(23):2335-2342.
104. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A. ve ark. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355(24):2542-2550.
105. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V. ve ark. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol.* 2009; 27(8):1227-34.
106. Miller JD, Sledge GW, Burstein HJ. Angiogenesis inhibition in the treatment of breast cancer: a review of studies presented at the 2006 San Antonio Breast Cancer Symposium. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2007; 5:1-12.
107. Shih T ve Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther.* 2006; 28(11):1779-1802.
108. Bürgermeister J, Paper DH, Vogl H, Linhardt RJ, Franz G. LaPSvS1, a (1-->3)-beta-galactan sulfate and its effect on angiogenesis in vivo and in vitro. *Carbohydr Res.* 2002; 337(16):1459-1466.

109. Kerbel R ve Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(10):727-739.
110. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):453-458.
111. Tamanini C ve De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:206-216
112. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation And Atherosclerosis. *Circ* 2002; 105: 1135-1143.
113. Timar J, Döme B, Fazekas K, Jnovics A, Paku S. Angiogenesis-Dependent Disorders And Angiogenesis Therapy. *Path Onco Resea* 2001; 2:85-94.
114. Olcay A, Nişancı Y, Sezer M, Özsaruhan Ö. Kardiyolojide Güncel Kök Hücre Uygulamaları *Türk Kardiyol Dern Arş* 2003; 31:776-80
115. Pınarlı AE, Ersek B, Yeşilçimen K, Uslubaş S, Gürkan K, Yavuz A. ve ark. İnfarktüsle İlgili Arteri Tıkalı Hastalarda Kollateral Dolaşımın Miyokard Canlılığı ile İlişkisi ve Sol Ventrikül Fonksiyonunun Korunmasında Önemi. *Türk Kardiyol Dern Arş* 1996; 24:97-101
116. Unger EF ve Sheffield CD, Epstein SE. Creation of anastomoses between an extracardiac artery and the coronary circulation. Proof that myocardial angiogenesis occurs and can provide nutritional blood flow to the myocardium. *Circulation*. 1990; 82:1449-1466
117. Kawamoto A, Murayama T, Kusano K, Li M, Tkebuchava T, Shintani S. ve ark. Synergistic effect of bone marrow mobilization and vascular endothelial growth factor-2 gene therapy in myocardial ischemia. *Circulation*. 2004; 110(11):1398-405.

118. Vardas PE, Auricchio A, Blanc JJ, Daubert JC, Drexler H. ve ark. Guidelines for cardiac pacing and cardiac resynchronization therapy: the Task Force for Cardiac Pacing and Cardiac Resynchronization Therapy of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2007; 28:2256–2295.
119. Vassort G, Bideaux P, Alvarez J. Could early ischemic arrhythmia triggered by purinergic activation of the transient receptor potential channels be prevented by creatine? *Exp Clin Cardiol.* 2010; 15(4): 104-8.
120. Cascio WE, Yang H, Muller-Borer BJ, Johnson TA. Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *J Electrocardiol.* 2005; 38(4):55-9.
121. Lynch SS ve Cheng CM. Bevacizumab for neovascular ocular diseases. *Ann Pharmacother.* 2007; 41(4):614-625.
122. Stergiou PK, Symeonidis C, Dimitrakos SA. Descending doses of intravitreal bevacizumab for the regression of diabetic neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89(3):218-21.
123. Türkay C, Gölbaşı İ, Ak İ, Şahin N, Erbasan O, Mete A. ve ark. The Prophylactic Effect Of Amiodaron On Arrhythmias And Left Ventricular Function After Coronary Baypas Surgery. *Turkish J Thorac and Cardiovasc Surg* 2000; 8:741-4
124. You B, Pu J, Liu N, Yu R, Ruan Y, Li Y. ve ark. Effect of lidocaine and amiodaron on transmural heterogeneity of ventricular repolarization in isolated rabbit hearts model of sustained global ischemia. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2005; 25(4):400-3.
125. Nagasawa Y, Chen J, Hashimoto K. Antiarrhythmic properties of a prior oral loading of amiodaron in in vivo canine coronary ligation/reperfusion-

induced arrhythmia model: comparison with other class III antiarrhythmic drugs. *J Pharmacol Sci.* 2005 Mar; 97(3):393-9.

126. Traupe T, Keller M, Fojtu E, Bhattacharya I, Lang M, Ha HR. ve ark. Antioxidant activity and sex differences of acute vascular effects of amiodaron in advanced atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50(5):578-84.