

1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

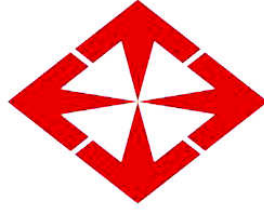
Anabilim Dalı

**İSKEMİYE İKİNCİL DAMARLANMA ESNASINDA ÇENTİK SİNYAL
YOLAĞININ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ozan Luay ABBAS

Ankara, 2012



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı

**İSKEMİYE İKİNCİL DAMARLANMA ESNASINDA ÇENTİK SİNYAL
YOLAĞININ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ozan Luay ABBAS

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Hüseyin BORMAN

Ankara, 2012

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ŞEKİLLER DİZİNİ	III
TABLolar DİZİNİ	IV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	V
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. YENİ DAMAR OLUŞUMU (NEOVASKÜLARİZASYON)	3
2.1.1 GENEL BAKIŞ	3
2.1.2 VASKÜLOGENEZ	4
2.1.3 ANJİYOGENEZ	5
2.1.4 NEOVASKÜLARİZASYON ESNASINDA ETKİLİ MEDİATÖRLER	6
2.2 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)	9
2.2.1 GENEL BAKIŞ	9
2.2.2 VEGF AİLESİ	9
2.2.3 VEGF RESEPTÖRLERİ	10
2.2.4 VEGF'NİN ETKİLERİ.....	11
2.2.5 VEGF SENTEZİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER	13
2.3 ÇENTİK SİNYAL YOLAĞI.....	14
2.3.1 GENEL BAKIŞ	14
2.3.2 ÇENTİK İLE İLGİLİ TEMEL BİLGİLER	14
2.3.3 ÇENTİK YOLAĞININ DAMARLANMADAKİ ROLÜ	15
2.3.4 ÇENTİK YOLAĞININ İNHİBİSYONU	17
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. HAYVANLARIN BAKIMI	20
3.2. ANESTEZİ VE ANALJEZİ	21
3.3. FLEP MODELİ VE CERRAHİ İŞLEM.....	21
3.4. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	23
3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	25

3.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	29
3.7. ELISA YÖNTEMİ İLE KANDA DLL4 VE VEGF TAYİNİ.....	31
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	32
IV. BULGULAR	33
4.1. GEN İFADELENMESİ	33
4.2. KANDA DLL4 VE VEGF SEVİYELERİ	36
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	38
V. TARTIŞMA	44
VI. SONUÇ.....	53
VII. ÖZET.....	54
VIII. ABSTRACT.....	57
IX. REFERANSLAR.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Çentik sinyal yolağının damarlanma üzerine etkisi.....	16
Şekil 3. 1: Dorsal deri flebinin hazırlanması	22
Şekil 3. 2: Dorsal deri flebinin kaldırılması.....	22
Şekil 3. 3: Dorsal deri flebinin tekrar yerine dikilmesi.....	23
Şekil 4. 1: Amplifikasyon Eğrisi.....	33
Şekil 4. 2: Erime Eğrisi.....	33
Şekil 4. 3: Dokuda VEGF gen İfadelenmesi.....	34
Şekil 4. 4: Dokuda DLL4 gen İfadelenmesi	35
Şekil 4. 5: Kanda DLL4 seviyeleri	37
Şekil 4. 6: Kanda VEGF seviyeleri.....	37
Şekil 4. 7: Kontrol grubunda IHK boyama	38
Şekil 4. 8: Cerrahi grubu I'de IHK boyama.....	39
Şekil 4. 9: Cerrahi grubu II'de IHK boyama	40
Şekil 4. 10: Cerrahi grubu III'te IHK boyama.....	41
Şekil 4. 11: Cerrahi grubu IV'te IHK boyama.....	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3. 1: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı	27
Tablo 3. 2: cDNA sentezi için reaksiyona eklenen karışım	27
Tablo 3. 3: GZ PZR ile analiz öncesi hazırlanan reaksiyon.....	28
Tablo 3. 4: GZ PZR işlemi.....	28
Tablo 4. 1: Kanda VEGF ve DLL4 protein seviyeleri.....	36
Tablo 4. 2: İstatistiksel Analizin Özeti.....	43

KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH:	Adrenokortikotropik Hormon
bFGF:	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
COX:	Siklooksijenaz
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
eNOS:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FGF:	Fibroblast Büyüme faktörü
HIF – 1:	Hipoksi ile İndüklenen Faktör
IGF:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL – 1:	İnterlökin - 1
IL – 6	İnterlökin - 6
KGF	Keratinosit Büyüme Faktörü
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PDGF	Trombosit Kaynaklı büyüme Faktörü
PGD2	Prostoglandin D2
PGE2	Prostoglandin E2
PGF2	Prostoglandin F2
PGI2	Prostoglandin I2

PGF	Plasental Büyüme Faktörü
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TSH	Tiroit Uyarıcı Hormon
TxA2	Tromboxan A2
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
DLL4	Delta Benzeri Ligand 4
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
Gz PRZ	Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu





I. Giriş ve Amaç

Yeni damar oluşumu; vücutta embriyogenez veya yara iyileşmesi gibi fizyolojik olarak veya tümör dokusunda olduğu gibi patolojik bir süreç kapsamında meydana gelmektedir. Dokularda yeni damar oluşumu; anjiyogenez ve vaskülogenez olarak iki mekanizma ile gerçekleşir.¹ Anjiyogenez, yeni damar oluşumunun mevcut kapiller yataktan meydana gelmesidir. Vaskülogenez, öncül hücrelerin farklılaşarak, damarlanma olmayan bir bölgede yeni damar yapısı oluşturmasıdır.²

Embriyonik dönemde meydana gelen damarlanma, genetik olarak programlanmıştır. Embriyonik dönemi takiben yeni damar oluşumu, dinamik bir işlem olup organizmanın metabolik, immünolojik ve büyüme gereksinimlerine cevap verecek biçimde gerçekleşmektedir. Bu dönemde, yeni damar oluşumu için en önemli uyarının hipoksi olduğu düşünülmektedir.³⁻⁵

Çentik sinyal yolağı, embriyonik gelişim esnasında hücre kaderinin belirlenmesi ve kök hücre devamlılığının sağlanmasında rol önemli rol oynamaktadır. Bu sistem temel olarak 4 transmembran reseptör (Çentik 1, 2, 3 ve 4) ile 5 adet ligandan oluşmakta (delta like ligand 1, 3, 4 ile Jagged 1 ve 2). Reseptörlerden Çentik 1, ligandlarında Delta Like Ligand 4 (DLL4) esas olarak endotelden salınmakta ve yeni damar oluşumunda rol almaktadır.

Çentik sinyal yolağı, yeni damar oluşumu esnasında yüksek vascular endotelyal growth factor (VEGF) seviyelerine bağılı olarak sentezlenmekte ve damarlarda VEGF'ye bağılı oluşan dallanmayı baskılamaktadır. Böylece ilgili dokunun gereksinimleri ile uyumlu olgun bir damar ağı oluşmaktadır.⁶

Daha önce yapılan çalışmalarda, Çentik sinyal yolağının embriyo ve tümör damarlarında aktive olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada temel olarak Çentik sinyal yolağının iskemi ile tetiklenen damarlanma esnasında etkili olup olmadığı sorusuna cevap aramaktayız. Cerrahi olarak iskemi yaratılan fleplerde DLL4 seviyelerinin yüksek saptanması durumunda, Çentik yolağının postembriyonik dönemde iskemiye ikincil damarlanma esnasında rol aldığını göstermiş olacağız.

Bir önkoşullama yöntemi olarak kabul edilen cerrahi geciktirme (delay) işlemi, flep sağkalımını klinik olarak arttırdığı defalarca gösterilen tek gerçekçi yöntemdir. Bu yöntemde, flep kısmi olarak kaldırılmakta ve flep distalinde nekroza yol açmayacak seviyede iskemi oluşturulmaktadır. Bu yöntemin klinik etkinliğini gösteren onca veriye rağmen etki mekanizması halen net bir biçimde ortaya konamamıştır. Bu amaçla birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmış olup çok farklı teoriler ortaya atılmıştır. Tüm bu teorilerin ortak noktası, meydana gelen değişikliklerin iskemiye bağılı olmasıdır.⁷⁻⁹ İskemiye ikincil damarlanma esnasında Çentik sinyal yolağının aktive olduğunu göstermemiz durumunda cerrahi geciktirme ile ilgili yeni bir etki mekanizması tariflemiş olacağız.

II. Genel Bilgiler

2.1. YENİ DAMAR OLUŞUMU (NEOVASKÜLARİZASYON)

2.1.1 Genel Bakış

Yeni damar oluşumu (neovaskülarizasyon); vücutta fizyolojik olarak embriyogenez, yara iyileşmesi, menstrüel döngü ve organların büyüme sürecinde söz konusu olmaktadır. Patolojik damar oluşumu ise başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları, retinopati ve psöriazis gibi hastalıklarda meydana gelmektedir.¹⁰

Dokularda yeni damar oluşumu; anjiyogenez ve vaskülogenez olarak iki mekanizma ile gerçekleşir.¹ Anjiyogenez, yeni damar oluşumunun mevcut kapiller yataktan meydana gelmesidir. Vaskülogenez, öncül hücrelerin farklılaşarak, damarlanma olmayan bir bölgede yeni damar yapısı oluşturmasıdır.²

Anjiyogenez ve vaskülogenezde endotel hücrelerinin kaynağı farklıdır. Vaskülogenezde endotel hücreleri kemik iliğinden bölgeye göç eden endotelial öncül hücrelerin farklılaşması ile oluşur. Anjiyogenezde ise doku kapillerlerinin endotel hücreleri çoğalarak, yeni oluşacak damarlar için endotel hücresi sağlar.

Embriyonik dönemi takiben yeni damar oluşumu, dinamik bir işlem olup organizmanın metabolik, immünolojik ve büyüme gereksinimlerine cevap verecek biçimde gerçekleşmektedir. Neovaskülarizasyon için esas uyaran, dokuya taşınan besin maddesi ve O₂ miktarı ile dokunun metabolik ihtiyacı arasındaki uyumsuzluktur.^{11,12} Bu uyumsuzluk, anabolik aktivite artışı, katabolik aktivite artışı veya hipoksi durumlarında söz konusudur.^{13,14}

2.1.2 Vaskülogenez

Vaskülogenez, endotel öncül hücrelerin farklılaşarak endotel hücrelerini oluşturması ve yeni damarlanma meydana getirmesidir.¹⁵ Vaskülogenez sadece embriyonik dönemde değil, erişkin dönemde de yeni damar oluşumunda önemli rol oynamaktadır.¹⁶ Yapılan çalışmalarda; yara iyileşmesi ve iskemik dokunun tekrar damarlanması sürecinde vaskülogenezin önemli rol oynadığı gösterilmiştir.¹⁷⁻²²

Endotel hücreleri embriyoda anjiyoblastlardan, erişkinde ise kemik iliğindeki endotelial öncül hücrelerden köken almaktadır.¹⁶ Dolayısı ile daha önce damar yapısı olmayan bir bölgede yeni damarlanma oluşmaktadır. Buna karşılık olarak, anjiyogenezde ise yeni damarlar, mevcut damar yapısından gelişmektedir.

Vaskülogenezde ilk aşama öncül hücrelerin hedef bölgeye göç etmesidir. Büyüme faktörleri, hücre göçünün yönlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır.^{23,24} Göç eden endotelial öncül hücreler ilgili dokuda kümeler oluşturmakta ve daha sonra tübülerize olup lümeni meydana getirmektedirler. Son olarak bu ilkel damar yapıları organize olup, devamlılığı olan fonksiyonel bir damar ağı meydana getirmektedir.^{25,26}

Vaskülogenez, birçok faktör tarafından kontrol edilen karmaşık bir durumdur. Embriyonik dönemde meydana gelen vaskülogenez, genetik olarak programlanmıştır. Sonraki dönemlerde ise hemodinamik değişiklikler ve çevresel faktörler vaskülogenez üzerine etkilidir. Doğum sonrası dönemde, vaskülogenez için en önemli uyarının hipoksi olduğu düşünülmektedir.³⁻⁵

2.1.3 Anjiyogenez

Anjiyogenez, mevcut kapiller yataktan endotel hücrelerinin aktivasyonu, göçü ve proliferasyonu ile karakterize yeni damar oluşumudur. Mevcut kapillerler tomurcuklanarak avasküler dokulara doğru uzanmaktadır.²⁷ Bu süreçte hipoksi, anjiyogenez için bilinen en önemli uyarandır.²⁸

Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu süreçteki temel hücreler, mevcut damardaki endotel hücreleridir. Nötrofil, makrofaj ve lenfosit benzeri hücreler salgıladıkları sitokinler ile anjiyogenezin diğer önemli elemanlarıdır.^{29,30}

Anjiyogenez süreci, mevcut damardaki endotel hücrelerinin angiogenik mediatörler tarafından aktive olması ile başlamaktadır. Aktive olan endotel hücreleri plasmin ve matriks metalloproteaz benzeri proteolitik enzimler sentezlemekte ve damar endotelini döşeyen bazal membranın yıkımını sağlamaktadır. Böylece, aktive endotel hücreleri bazal membrandan ayrılıp hipoksik gradient boyunca doku içinde göç etmeye başlamaktadır. Göç eden endotel hücreleri, ilgili dokuda kümeler şeklinde birikmekte ve daha sonra lümeni olan bir tüp şeklini alacak biçimde organize olmaktadır.³¹

2.1.4 Neovaskularizasyon esnasında etkili mediatörler

Vaskülogenez ve anjiyogenez, bir takım mediatörlerin kontrolü altında olan karmaşık süreçlerdir. Bu mediatörlerin bir kısmı aktivatörken, diğerleri inhibitör olarak görev yapmaktadır.

Vascular endothelial growth factor (VEGF), neovaskularizasyon esnasında en önemli role sahip mediatördür. Vaskülogenezde endotelial öncül hücrelerin göçünden ve farklılaşmasından başlayıp, fonksiyonel damar oluşumuna kadar her basamakta VEGF gereklidir.^{2,32-34} Anjiyogenezde ise VEGF, endotelial hücrelerin aktivasyonu, migrasyonu ve proliferasyonuna yol açmakta. Ayrıca yeni oluşmuş damarların tüp formasyonunu almasında rolü vardır.³⁵

Fibroblast growth factor (FGF) ailesi, toplam 22 üyeden oluşmaktadır; bunlardan FGF-1 (asidik FGF) ile FGF-2 (bazik FGF) damar oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. FGF diğer mediatörlerden farklı olarak endotel, damar düz kası, fibroblast gibi damar oluşumu için gerekli tüm hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu tetiklemektedir.^{36,37}

Neovaskularizasyonda etkili diğer bir mediatör ise Anjiyopietin'dir. Anjiyopietin ailesinin 4 üyesi vardır: Anjiyopietin-1 , Anjiyopietin-2, Anjiyopietin-3 ve Anjiyopietin-4. Bu mediatörler bir tirozin kinaz reseptörü olan Tie-2'ye bağlanarak fonksiyon gösterirler. Yeni damar oluşumunda özellikle Anjiyopietin-1 ve Anjiyopietin-2 önemli rol oynamaktadır. Bu mediatörler vaskülogenez veya angiogenez ile oluşmuş damarsal ağın olgunlaşmasını sağlamaktadır. Anjiyopietin geni mutant sıçan embriyolarında major vasküler anomaliler saptanmıştır. Bu sıçan embriyolarında herhangi bir vaskülogenez

defekti saptanmamış olup mevcut damarsal ağlarda endotel hücrelerinin çevre matrice yapışma problemi vardır.³⁸

Dokuya taşınan O₂ miktarının yetersizliği sonucu oluşan hipoksi, embriyoda ve erişkinde neovaskülarizasyonun en önemli uyarandır.^{39,40} Hipoksi, dokuda HIF-1 sentezlenmesine sebep olmaktadır. HIF-1, başta VEGF ve anjiyopietin olmak üzere birçok mediatörün salınımını tetiklemektedir.⁴¹

Nitrik oksit (NO), neovaskülarizasyonun önemli düzenleyicilerinden birisidir.⁴² NO, kan akımının yeni gelişen damar duvarlarına uyguladığı mekanik gerime cevap olarak eNOS enzimi tarafınca sentezlenir.⁴³ Yapılan çalışmalarda sentezlenen bu NO'nun damar ağının şekillenmesinde belirleyici faktör olduğu gösterilmiştir.³ Ek olarak hücresele eNOS aktivasyonunun göç eden epitelyal öncül hücreler için önemli bir düzenleyici olduğu tespit edilmiştir.⁴⁴

Düşük seviyedeki reaktif oksijen türlerinin yeni damar oluşumu için güçlü bir uyarıcı iken tam tersine yüksek seviyeleri damar oluşumunu ciddi derecede baskılamaktadır.^{1,45,46} NADPH-oksidadaz enzimi, endotel hücrelerinde oluşturulan oksidanların ana kaynağıdır.⁴⁷ Bu reaktif oksijen türleri VEGF ve VEGFR-2 sentezini uyarmaktadır. İn vitro ortamda düşük miktardaki oksidanların, endotel hücre canlılığını artırdığı ve tüp yapıları oluşturmalarını sağladığı görülmüştür.¹ Çalışmalarda, oksidan moleküllerin uzaklaştırılmasının veya ortama antioksidanlar eklenmesinin, yara bölgesindeki neovaskülarizasyonu ciddi derecede azalttığı, yara iyileşmesini bozduğu belirlenmiştir.⁴⁸⁻⁵⁰ Embriyonik hücrelerin anjiyogenez oluşturmasında, reaktif oksijen türlerinin destekleyici olduğu görülmüştür.⁵¹ Ancak oksidan seviyesinin çok artması, anjiyogenezi önemli derecede baskılar.⁵²

Siklooksijenaz (COX), araşidonik asitten prostaglandinlerin sentezinde ilk iki basamağı katalizleyen enzimdir.⁵² Anjiogeneizde rol oynayan esas prostanoidler; Prostaglandin E2 (PGE2), Prostaglandin F2 α (PGF2 α), Prostaglandin D2 (PGD2), Prostaglandin I2 (PGI2) ve Tromboksan A2 (TXA2)'dir. COX enziminin iki izoformu vardır; COX-1, yapısal form olup normal fizyolojik fonksiyonların devamında rol oynar. COX-2, indüklenabilir formdur ve proinflatuvar sitokinler ile büyüme faktörleri tarafından uyarılarak aktive edilir. Deneysel çalışmalar, endotel hücrelerindeki COX-1 ve COX-2'nin anjiogeneiz üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.⁵³⁻⁵⁵

2.2 VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

2.2.1 Genel Bakış

Yeni damar oluşumu ve olgunlaşması, endotel hücrelerindeki birçok reseptörün aktive edilmesini gerektiren kompleks ve koordine bir işlemdir.⁵⁶ Bilinen tüm anjiyogenik faktörler içinde VEGF, anjiyogenez ve vaskülogenez esnasında en önemli rolü oynayan mediatördür.⁵⁷ Endotel hücreleri için mitojenik olduğu gözlenen VEGF, 1989 yılında Ferrara ve Henzel tarafından tanımlanmış olup ismini hedef aldığı spesifik hücreden almaktadır.⁵⁸

2.2.2 VEGF Ailesi

VEGF ailesi toplam 6 üyeden oluşmaktadır; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (PGF).¹ Bu mediatörler temel olarak endotel hücreleri ve keratinositlerden salgılanmaktadır.^{59,60} Son dönemlerde yapılan çalışmalarda, nötrofil ve makrofajlarda da VEGF sentezlediği gösterilmiştir.^{61,62}

VEGF-A; insanda ilk tayin edilen alt tip olup bilimsel yazılarda sıklıkla sadece VEGF olarak ifade edilir.⁶³ VEGF-A, reseptörlerden VEGFR-1 ile VEGFR-2'ye bağlanarak fonksiyon gösterir. VEGF-B, VEGFR-1 ile etkileşerek embriyonik dönemde anjiyogenezi tetiklemektedir. VEGF-C ve VEGF-D, VEGFR-3'e bağlanıp postembriyonik dönemde lenfanjiyogenezde görev alırlar.⁶⁴ VEGF-E sadece VEGFR-2'ye bağlanır ve insan endotel hücrelerinin tüp yapılı oluşturmada ve NO sentezlenmesinde görevlidir. Plasental büyüme faktörü VEGFR-1 ile etkileşip, embriyonik dönemde vaskülogenezde fonksiyon görmektedir.

2.2.3 VEGF Reseptörleri

VEGF reseptörleri temel olarak vasküler endotel hücrelerinde ve monositler gibi kemik iliği kökenli hücrelerde tesbit edilmiştir.⁶⁵ VEGF, hücrelerde 3 farklı tirozin kinaz reseptörüne bağlanır; VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3.^{1,66} Bu reseptörlerden VEGFR-1 ve VEGFR-2 vaskülogenez ve anjiyogenezden sorumlu iken, VEGFR-3 esas olarak lenfanjiyogenezden sorumludur.

VEGFR-1 hücre tipine ve gelişim basamağına göre farklı yanıtlar oluşturabilmektedir. VEGFR-1, bir “yem” reseptörü olarak görev yapıp, VEGF’in VEGFR-2 üzerinden gösterdiği etkileri kontrol etmektedir. VEGF’in bu reseptöre bağlanması ile asıl aktivitesini göstereceği VEGFR-2’ye bağlanan miktarı, dolayısıyla aktivitesi azalmaktadır.⁶⁷ Xue tarafından yapılan çalışmada, VEGFR-1’in antikolar ile bloke edilmesinin anjiyogenezde belirgin artış sağladığı gösterilmiştir. Sonuçta; anjiyogenez gerektiğinde VEGFR-2 sentezinin arttığı, anjiyogenezin sonlandırılması gerektiğinde ise VEGFR-1 reseptör sentezinin arttığı belirlenmiştir.⁶⁸ PGF, VEGFR-1 reseptörüne bağlanarak VEGF’nin aynı reseptöre bağlanmasını engeller. Böylece VEGF’nin VEGFR-2’ye bağlanarak, etki gösteren aktif miktarın artmasına sebep olur.⁶⁷ Embriyogenez döneminde ise VEGFR-1’in vaskülogenez ve anjiyogenez üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu düşünülmektedir.⁶⁹ VEGFR-1 geni mutant sıçan embiyolarında kontrolsüz çoğalan anjiyoblastlar saptanmıştır. Vaskülogenez ve anjiyogenezdeki rollerine ek olarak, VEGFR-1 aktivasyonu monosit kemotaksisine ve enflamatuar mediatörlerin salgılanmasına yol açar, böylece enflamatuar cevapta bir artış meydana gelmektedir.⁷⁰ VEGFR-1’in, hematopoezi ve hematopoetik hücre canlılığını artırıcı etkileri ortaya konmuştur. Ayrıca, indirekt olarak hepatosit çoğalmasına sebep olduğu gösterilmiştir.⁷¹

VEGF'nin mitojenik, anjiyogenik ve damar geçirgenliğini artırıcı etkilerini göstermesinde görev alan esas reseptörün VEGFR-2 olduğu bilinmektedir.¹ VEGF'nin bu reseptöre bağlanması ile eNOS sentezlenir ve dokuda NO seviyeleri artar.¹ VEGFR-2 geni mutant sıçan embriyolarında vaskülogenez görülmemiş ve organize damar yapıları oluşmamıştır.⁷² VEGFR-2, VEGF'nin vazodilatasyon etkisinden de sorumludur.⁷³ Bazı hematopoetik hücrelerde bu reseptörün saptanması, hematopoezde de rolü olduğunu düşündürmektedir.⁷⁴ Endotel hücreleri için sadece VEGFR-2'nin apoptozu azaltıcı etkisi bildirilmiştir.⁷⁵ Hem VEGFR-1 hem de VEGFR-2 reseptörlerinin, endotelyal öncül hücrelerin göçünde etkili oldukları tespit edilmiştir.

VEGFR-3, embriyonik kalp-damar sistemin ve lenfatik damarların gelişimi için çok önemlidir. Erişkinde ise sadece lenfatik endotelde bulunduğu gözlenmiştir. Bu reseptör, VEGF-C ve VEGF-D proteinlerinin bağlanmasıyla lenfanjiyogenez oluşumuna yol açmaktadır.^{76,77}

2.2.4 VEGF'nin Etkileri

VEGF, endotel hücrelerinin in-vivo ve in-vitro ortamlarda, büyümesini ve çoğalmasını sağlar.⁷⁸⁻⁸⁰ Endotel hücre göçünde VEGF, çok önemli bir uyarandır.^{78,80,81} İn-vitro modellerde endotel hücrelerini uyarak kapiller benzeri yapılar oluşturduğu belirlenmiştir.⁸² İn-vivo modellerde, anjiyogenik cevabı artırır.⁸³ Farelerin bazı dokularında lenfanjiyogenez meydana getirdiği gözlenmiştir.⁸⁴ VEGF'nin, kültüre edilen endotel hücrelerinde antiapoptotik proteinlerin sentezlenmesine yol açtığı belirlenmiştir.⁸⁵ VEGF'nin yokluğunda endotel hücrelerinin apoptoza gittiği yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.^{86,87} VEGF; endotel hücrelerini uyarak, proteolitik enzimler salgılamalarını sağlar.^{78,80,81} Bu durum, hücre dışı matrix'in yıkılmasında ve yeni damar oluşumunun ilerlemesinde önemli bir basamaktır.

VEGF'nin, monosit ve nötrofil kemotaksisini artırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.⁸⁸ VEGF, aynı zamanda olgunlaşmamış myeloid hücrelerinin üretimini artırmakta ve hematopoez sırasında kök hücrelerinin devamlılığını sağlamakta da rol almaktadır.^{75,89} VEGF'nin önemli etkilerinden birisi de kemik iliğindeki endotel öncül hücrelerin, periferik dolaşıma geçişlerini sağlamaktır.^{22,78,80,81,90,91} Bu durum erişkinde meydana gelen vaskülogenezin ilk basamağını oluşturur.

VEGF, damar geçirgenliğinde artışa yol açarak inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynamaktadır.⁷⁸ Birçok çalışmada bu etkinin, nitrik oksit bağımlı olduğu gösterilmiştir.^{92,93} Anjiyogenez ile damar geçirgenliğinin artışı, bağlantılı birer durumdur; çünkü anjiyogenezin oluşabilmesi için önce damar geçirgenliğinin artması ve dolayısı ile ihtiyaç duyulan maddelerin damar çevresinde birikmesi gerekmektedir.⁹⁴

DeneySEL çalışmalarda, VEGF'nin vazodilatasyona sebep olduğu gösterilmiştir.⁷³ Flep kaldırılmasından hemen önce verilen VEGF'nin, anjiyogenez oluşturmaktan ziyade, bu şekilde flep canlılığını artırdığı düşünülmektedir. VEGF, VEGFR-2 reseptörüne bağlanarak ve NO sentezlenmesini sağlayarak vazodilatasyon oluşturmaktadır. Vazodilatasyona sebep olan NO üretiminde görevli esas enzimin eNOS olduğu, diğer izoformların etkili olmadığı belirlenmiştir.⁷³

2.2.5 VEGF Sentezini Etkileyen Faktörler

VEGF sentezi, hipoksi ve iskemi durumlarında belirgin bir biçimde artmaktadır.^{81,95,96} VEGF mRNA ekspresyonu, kısmi oksijen basıncının düşük olduğu patofizyolojik durumlarda artar.⁹⁷ Bu cevabın düzenlenmesinde, HIF-1 molekülünün anahtar rol oynadığı bilinmektedir.⁹⁸ Hipoksi, bazı durumlarda paradoksik olarak VEGF aktivitesini azaltabilir.^{99,100} Örneğin; iskemik yaralarda aktive edilmiş plazmin seviyeleri artmıştır. Plazmin, VEGF'nin heparine bağlanmasını sağlayan kısmını keser ve böylece VEGF'nin biyoaktivitesini azaltır.

Bazı büyüme faktörleri, VEGF sentezini artırmaktadır. Bunların başlıcaları: EGF, TGF- α , TGF- β , KGF, IGF, FGF ve PDGF'dir.¹⁰¹ IL-1 ve IL-6, VEGF gen ekspresyonunu artıran enflamatuvar sitokinlerdir. Bu durum, VEGF'nin enflamatuvar durumlarda, damar geçirgenliğindeki ve anjiyogenezdeki artıştan sorumlu olduğunu düşündürmektedir.¹⁰² Hormonlar da VEGF sentezinin kontrolünde görev alır. Tiroid uyarıcı hormon (TSH), adrenokortikotropik hormon (ACTH), gonadotropinler ve cinsiyet steroidlerinin (östrojen, testosteron) hedef hücrelerinde, VEGF sentezini artırabildikleri gösterilmiştir.^{103,104}

Mikromoleküler konsantrasyonda, oksidanların VEGF-A ekspresyonunu artırdığı belirlenmiş olup, bu etki "HIF" bağımsızdır.¹⁰⁵ Oksidanların, VEGFR-2 sentezini uyardığı gösterilmiştir. VEGFR-1 ise oksidanlara duyarsızdır.¹⁰⁶ Klinik ve deneysel çalışmalarda, mekanik gerilim kuvvetinin, VEGF sentezlenmesine sebep olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁷

2.3 ÇENTİK SİNYAL YOLAĞI

2.3.1 Genel bakış

1919 yılında meyve sineklerinin kanatlarında çentiklenmeye yol açan bir gen mutasyonu saptanmıştır.¹⁰⁸ 1980'li yıllarda klonlanan bu genin ürününe bu nedenle Çentik (Çentik) reseptörü adı verilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu reseptörün ait olduğu yolağın embriyonik gelişim sürecinde hücre kaderinin belirlenmesi ve devamlılığının sağlanmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.¹⁰⁹

2.3.2 Çentik ile ilgili temel bilgiler

Memelilerde Çentik sinyal yolağı temel olarak 4 reseptör (Çentik 1, 2, 3 ve 4) ile 5 adet ligandan oluşmaktadır (Delta like ligand 1, 3, 4 ile Jagged 1 ve 2). Bu reseptör ve ligandlar hücre yüzeyinde bulunan transmembran proteinlerdir. Dolayısıyla bu yolağın aktivasyonu reseptör ile ligandları içeren, komşu hücrelerin teması ile gerçekleşmektedir.

Çentik reseptörleri transmembran proteinler olup biri hücre içi diğeri ise hücre dışı olmak üzere iki parçadan oluşmaktadırlar. Reseptör ve ligandın etkileşimini takiben aktive olan metalloproteazların yardımı ile hücre dışı ve hücre içi parçalar birbirlerinden ayrılmaktadır.¹¹⁰ Daha sonra γ -Sekretaz kompleksi aktive olmakta ve hücre içi parçayı membrandan tamamen ayırmaktadır.¹¹¹ Ayrılan parça hücrenin çekirdeğine transloke olmakta ve transkripsiyon faktörlerini aktive edip, genetik aktivasyona yol açmaktadır.

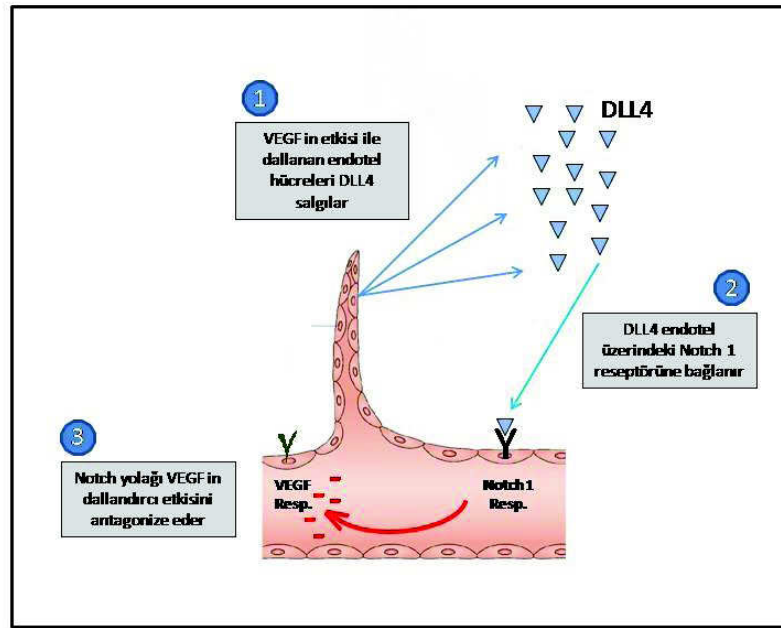
Embriyonik gelişim sürecinde, Çentik sinyal yolağı bir çok farklı dokuda apoptozis, farklılaşma ve çoğalma işlemlerinde önemli roller almaktadır. Bu dokuların en önemlisi vasküler dokudur. Bu yolak; vasküler gelişim için önemlidir ve aksaması çeşitli vasküler malformasyonlara yol açmaktadır. İnsanlarda Çentik sinyal yolağının mutasyonları çeşitli vasküler anomaliler ile karakterize Alagille sendromu ile vasküler demans ve inme ile karakterize subkortikal enfarktüs ve lökoensefelopatili serebral otozomal dominant arteriopati ile ilişkilendirilmektedir.^{112,113}

2.3.3 Çentik Yolağının Damarlanmadaki Rolü

Reseptörlerden Çentik 1, ligandlardan ise Delta like ligand 4 (DLL4) esas olarak endotel hücrelerinde sentezlenmekte ve angienezde rol almaktadır.¹¹⁴ DLL4 geni mutant sıçan embriyolarında ağır vasküler malformasyonlara bağlı olarak ölüm görülmektedir.^{115,116} Aynı şekilde Çentik 1 reseptör geninde mutasyon olan sıçan embriyolarının yolk kesesinde, plasentasında ve embriyonun kendisinde vasküler gelişim defektleri gözlenmekte ve ölüm ile sonuçlanmaktadır.¹¹⁷⁻¹²¹

Çentik Sinyal yolağı embriyonik angienez esnasında primitif vasküler pleksusun organize hiyerarşik bir ağa dönüşmesinde kritik rol oynamaktadır. Altta yatan mekanizma VEGF'in damarlar üzerindeki dallandırıcı etkisinin antagonize edilmesidir. Angienez esnasında ana damarlarda beliren uç hücreleri dallanmaya klavuzluk etmektedir. Bu uç hücreleri yapısal olarak; ana damar üzerindeki sap hücrelerinden farklıdır. Uç hücreleri yoğun bir biçimde DLL4 proteini sentezlerken, ana damar üzerindeki sap hücreleri Çentik 1 reseptörü sentezlemektedir.^{6,122,123} Bu esnada VEGF uç hücrelerinin migrasyonunu tetiklerken, sap hücrelerinde proliferasyona yol açmaktadır.^{124,125} Böylece VEGF'in etkisi ile uç hücreleri ana damardan göçerken, proliferen olan sap

hücrelerine klavuzluk etmekte ve yeni dal oluşumuna yol açmaktadır. Bu dallanma belirli bir aşamaya gelince, uç hücrelerdeki DLL4 ligandı sap hücrelerindeki Çentik 1 reseptörü ile etkileşir ve Çentik sinyal yolağı aktive olur. Bunun sonucunda VEGF'e karşı bir duyarsızlık oluşur ve dallanma işlemi durur. (Şekil 2.1)



Şekil 2. 1: Çentik sinyal yolağının damarlanma üzerine etkisi

Çentik sinyal yolağı damarın arter veya ven yolunda farklılaşmasına aracılık etmektedir. Embriyonik dönemde transkripsiyon faktörleri Foxc1 ve Foxc2 ile VEGF damarın arter yönünde farklılaşmasını sağlamaktadır.¹²⁶⁻¹²⁸ Bu mediatörlerin aktivasyonu damarlarda DLL4 sentezini indüklemektedir.¹²⁷ Dolayısı ile DLL4 arteriyel fenotip için bir marker olarak kabul edilebilir. DLL4 geni mutant sıçanların aortalarında arteriyel marker yokluğu ve venüler marker aktivasyonu söz konusudur.^{115,116,129} Ven yönünde farklılaşma ise bir nükleer reseptör olan COUP-TFII tarafından sağlanmakta ve bu mediatör damarda Çentik 1 İnhibisyonuna yol açmaktadır.¹³⁰

Çentik sinyal yolağı damar oluşumunu takiben damarın integrasyon ve hemostazında önemli rol oynamaktadır. bu fonksiyonun nasıl sağlandığı halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası mekanizmalardan ilki endotel hücrenin hayatiyeti ile ilgilidir; endotel hücrelerinde Çentik aktivasyonu hücrenin apoptozise gitmesini engellemekte ve dolayısı ile in vivo etkenlere bağlı hücre ölümünü baskılamaktadır.¹³¹ Diğer bir olası mekanizma ise endotel hücrenin nonproliferatif farklılaşmış halinin idame ettirilmesidir. Çentik aktivasyonu endotelin otonomik proliferasyonunu engellemekte ve son olarak Çentik sinyal yolağı, damarın arteryel fenotipini idame ettirmesinde rol almaktadır.¹³² Damarlarda arter ile ven arası intrinsik farklılıkların idamesi damarın fonksiyonu açısından önemlidir.¹³³

Çentik yolağının reseptör ve ligandları vasküler sistemde endotel hücrelerine ek olarak, damar düz kasında da sentezlenmekte ve embriyonik dönemde damarlarda yumuşak kasın organizasyonunda rol almaktadır. Reseptörlerden Çentik 1 ve 3 , ligandlardan ise Jag 1 ve 2 esas olarak damar düz kasında sentezlenmektedir.¹³⁴⁻¹³⁶ Çentik 3 reseptör geni mutant sıçanlarda damar yumuşak kas patolojilerine bağlı olarak, anormal genişlikte damar yapıları tespit edilmiştir.¹³⁷

2.3.4 Çentik yolağının inhibisyonu

γ sekretaz Çentik yolağının aktivasyonu sırasında transmembranöz Çentik reseptörünün hücre içi parçasının, membrandan ayrılmasını sağlamaktadır. Ayrılan parça, daha sonra hücrenin çekirdeğine transloke olmakta ve etkisini genetik biçimde göstermektedir. Dolayısı ile γ sekretazın inhibisyonu ile Çentik yolağının aktivasyonu engellenebilmektedir.^{135,136}

Gelişmekte olan sıçan embriyosu üzerinde yapılan bir çalışmada γ sekretaz inhibitörlerinin (GSI) sistemik olarak uygulanması ile gelişmekte olan retinal damarlarda bir dallanma artışı saptanmıştır.⁶ Bu çalışmada GSI uygulamasının sadece dallanmakta olan distal damarlarda etkili olduğunu ve ana damarda herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca GSI uygulanan sıçan embriolarında retinal VEGF seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla ile Çentik sinyal yolağı, sadece VEGF'in dallandırıcı etkisini bloke etmektedir. Bu mediatörün salınımına herhangi bir etkisi olmamaktadır.

III. Gereç ve Yöntem

Çalışmamız, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nda değerlendirildi ve onaylandı. Deney, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvar'ında gerçekleştirildi.

Çalışmada ağırlığı 350 – 410 gram olan 30 adet erkek “Sprague Dawley” cinsi sıçan kullanıldı. Bu sıçanlar 2 gruba ayrıldı:

Grup I (N = 6) → Kontrol grubu

Bu grupta yer alan 6 sıçana herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Cerrahi grubunda kullanılan McFarlane flebinin distal kısmına denk gelen bölgeden doku biopsisi yapıldı. Kalp içinden kan örnekleme yapıldıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi.

Grup II (N = 24) → Cerrahi grubu

Bu grupta yer alan 24 sıçanda McFarlane dorsal deri flebi kaldırıldı ve tekrar yerine dikildi. Bu gruptaki sıçanlar doku ve kan örnekleme yapıldığı güne göre 4 alt gruba ayrıldı:

Cerrahi grubu I: Doku ve kan örnekleme cerrahi sonrası 1. gün yapıldı ve takiben ratlar sakrifiye edildi.

Cerrahi grubu II: Doku ve kan örnekleme cerrahi sonrası 3. gün yapıldı ve takiben ratlar sakrifiye edildi.

Cerrahi grubu III: Doku ve kan örnekleme cerrahi sonrası 5. gün yapıldı ve takiben ratlar sakrifiye edildi.

Cerrahi grubu IV: Doku ve kan örnekleme cerrahi sonrası onuncu gün yapıldı ve takiben ratlar sakrifiye edildi.

Gruplardan alınan kan ve doku örneklerinde temel olarak 5 farklı parametre incelendi:

1. ELISA yöntemi ile kanda DLL4 seviyelerinin ölçümü.
2. ELISA yöntemi ile kanda VEGF seviyelerinin ölçümü.
3. GZ - PZR yöntemi ile dokuda DLL4 mRNA tayini.
4. GZ – PZR yöntemi ile dokuda VEGF mRNA tayini.
5. İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri ile dokuda DLL4 proteinin tayini.

3.1. HAYVANLARIN BAKIMI

Çalışmada ağırlığı 350 – 410 gram olan 30 adet erkek “Sprague Dawley” cinsi sıçan kullanıldı. Dişi hayvanlardaki hormonal değişikliklerden etkilenmemek adına tüm hayvanlar erkek olarak seçildi. Denekler Başkent Üniversitesi Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi.

Tüm deney hayvanlarına, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde standart oda şartları sağlandı. Oda ısısı 18 - 20°C arası sabitlendi. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Sıçanların birbirine zarar vermemeleri adına her kafeste bir adet sıçan barındırıldı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar intraperitoneal 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) enjekte edilerek sakrifiye edildi.

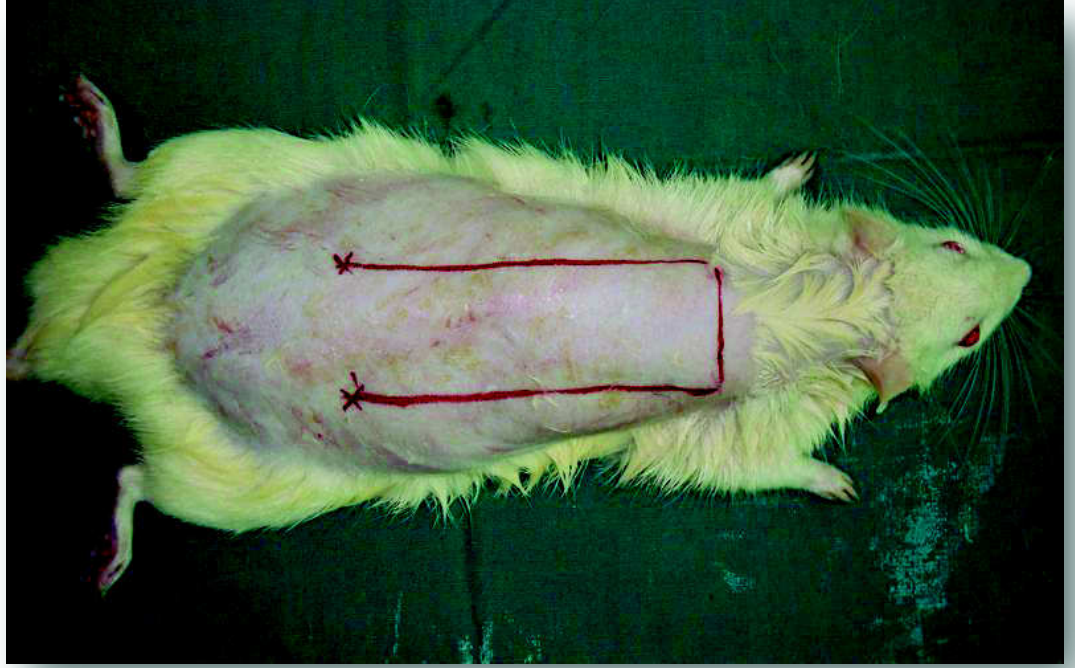
3.2. ANESTEZİ VE ANALJEZİ

Anesteziye intraperitoneal 40mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) ve 5mg/kg ksilazine hidroklorür (Rompun, Bayer inc) kullanıldı. Anestezinin derinliği ekstremite çekme yanıtı ile değerlendirildi. Anestezinin idamesi, başlangıç dozunun %50'si ile sağlandı. Cerrahi işlemi takiben tüm hayvanlara cilt altı 0.02 mg/kg fentanil (Sufenta 5 mcg, Janssen Cilag inc) ile analjezi uygulandı.

3.3. FLEP MODELİ VE CERRAHİ İŞLEM

Bu çalışmada iskemi modeli olarak random paternli dorsal deri flebi tercih edilmiştir. Anesteziyi takiben cerrahi alan elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi ve cerrahi masaya yüzüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Cerrahi alan %10 povidon-iodin ile temizlendi ve cerrahi boyunca sterilite koşulları sağlandı.

Her iki iliak kemik çıkıntısı palpasyon ile belirlenerek işaretlendi. Flep tabanı, işaretlenen iliak kemik çıkıntıları arasındaki hat olarak belirlendi. Daha önce hazırlanan 3x9 cm boyutundaki model yardımıyla flep çizildi (Şekil 3.1). Flep deri ve panniculusu içerecek şekilde kaudal bazlı olarak kaldırıldı (Şekil 3.2). Flep kendi yerine, 3.0 ipek dikiş (Doğsan Ltd) ile tekrar dikildi.



Şekil 3. 1: Dorsal deri flebinin hazırlanması



Şekil 3. 2: Dorsal deri flebinin kaldırılması



Şekil 3. 3: Dorsal deri flebinin tekrar yerine dikilmesi

3.4. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Kontrol grubunda yer alan sıçanlarda doku örnekleme, cerrahi grubunda kullanılan McFarlane flebinin distal kısmına denk gelen bölgeden yapıldı. Her bir sıçandan 2 X 2 cm lik doku örneği alındı ve iki eşit parçaya ayrıldı. İmmünohistokimyasal analiz için kullanılacak parça %10 neutral buffered formalin içinde saklanırken, genetik analiz için kullanılacak parça fosfat tamponlu salin içinde saklandı. Kan örnekleri, anestezi altındaki sıçanın kalbinden 22 gauge iğneli enjektör yardımı ile alındı. Her bir sıçandan ortalama 5 cc kan alındı. Heparinli tüplere alınan örnekler, 4000 devir/dk hızında, 10 dakika boyunca santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri, analiz gününe kadar -20°C'deki derin dondurucuda saklandı.

Cerrahi grubunda yer alan sıçanlarda doku örnekleme, McFarlane flebinin distal 1/3'lük kısmın proksimal kısmından yapıldı. Her bir sıçandan 2 X 2 cm lik doku örneği alındı ve iki eşit parçaya ayrıldı. İmmünohistokimyasal analiz için kullanılacak parça %10 neutral buffered formalin içinde saklanırken, genetik analiz için kullanılacak parça fosfat tamponlu salin içinde saklandı. Kan örnekleri, anestezi altındaki sıçanın kalbinden 22 gauge iğneli enjektör yardımı ile alındı. Her bir sıçandan ortalama 5 cc kan alındı. Heparinli tüplere alınan örnekler, 4000 devir/dk hızında, 10 dakika boyunca santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri, analiz gününe kadar -20°C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.5. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Kontrol grubuna ait 6 sıçandan alınan doku örneklerinde, semikantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile normoperfüze dokuda DLL4 ve VEGF gen ifadelenmeleri tayin edildi. Cerrahi uygulanan gruptan farklı günlerde alınan doku örneklerinde ise, iskemik dokuda DLL4 ve VEGF gen ifadelenmeleri tayin edildi.

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PZR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin, hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır.

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yönteminde, amplifiye edilen ürünün varlığı çift zincirli DNA boyaları ile tespit edilmektedir. Bu amaçla en sık kullanılan boya SYBR Green I'dir. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgeye ait olup olmadığını anlamak için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılır. Çoğaltılan hedefin özgül olarak saptanması amacıyla işaretli probalar kullanılır.

Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır; birinci basamakta sıçanlardan alınan doku örneklerinden RNA izolasyonu yapılmaktadır. Daha sonra, izole edilen RNA molekülleri ters olarak cDNA'ya transkribe edilmekte ve GZ-PZR ile genlerdeki ifadenme düzeyleri tayin edilmektedir.

Oluşturulan deneysel model kapsamında, sıçanlardan alınan 1 x 1 cm'lik doku örneklerinin ağırlıkları ölçüldü ve yaklaşık 20 mg dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics. GmbH, Mannheim) kullanıldı. RNA izolasyonu, aşağıda tarif edilen protokole göre gerçekleştirildi:

- Her örnekten yaklaşık 20 mg ağırlığındaki doku bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı.
- Daha sonra üzerlerine 400 µl lizis/bağlanma tamponu eklendi ve bu halde 20 Gauge'lik iğneden 5 – 10 kez geçirilerek dokuların parçalanması sağlandı.
- Sonrasında 14000 x g'de santrifüj edilerek doku parçalarının çökmesi sağlandı ve üstte kalan süpernatant ayrı bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.5 hacim %99'luk etanol eklendi ve vartekslenerek iyice karışması sağlandı
- Bu karışım kitin içinden çıkan kolonlara aktarıldı (max 700µl) ve 30 sn 14000 x g'de santirfüj edildi.
- Her kolona daha önce hazırlanan 90 µl DNase inkübasyon tamponu ve 10 µl DNase I solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Yıkama tamponu ile üç defa yıkamayı takiben, total RNA 80 µl elution buffer içinde elde edildi.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve kalitesi Nanodrop 2000 (Thermo Sci.) kullanılarak analiz edildi

İzole edilen RNA'lerden Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kiti (Roche Diagnostics. GmbH, Mannheim) kullanılarak cDNA sentezlendi. cDNA sentezi, aşağıda tarif edilen protokole göre gerçekleştirildi:

- İlk olarak aşağıda vermiş olan reaksiyon karışımı hazırlanmıştır:

İçerik	Hacim (µl)	Son hacim
Total RNA	Gerekli miktarda	1 ng
Random Hexamer Primer (600 pmol/µl)	2 µl	60 µM
dH ₂ O	Gerekli miktarda	Toplam hacim 11.4 µl olacak miktarda
Total Volüm	11.4 µl	

Tablo 3. 1: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

- Yukarıda hazırlanan reaksiyon 65°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra herbir tüpe aşağıda içeriği verilen karışım eklenmiştir.

İçerik	Hacim (µl)	Son hacim
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Buffer, 5x	4	1 x
Protector RNase Inhibitor 40 U/ µl	0.5	20 U
dNTP karışımı, 10 µM	2.0	1 mM (herbiri)
DTT	1.0	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1.1	10 U
Total Volüm	20	

Tablo 3. 2: cDNA sentezi için reaksiyona eklenen karışım

- Hazırlanan karışım PZR cihazında (GeneAmp® PCR System 9700) 55°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi.

VEGF ve DLL4 genlerinin ifadenme düzeyleri, housekeeping gen olarak β -aktin kullanılarak incelenmiştir. Her bir örnekten elde edilen cDNA'lar SYBR Green I boyası kullanılarak semikantitatif GZ PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda, cerrahi uygulanan doku örneklerinde VEGF ve DLL4 genlerinin ifadenmelerinde oluşan değişiklikler incelenmiştir. Bu amaçla LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (Roche Diagnostics. GmbH, Mannheim) kullanıldı. Her bir örnek için aşağıda verilen reaksiyon hazırlanmış olup, Light Cycler 1.5 GZ PZR cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak genlerin ifadenme düzeyleri incelenmiştir.¹³⁸

İçerik	Hacim (μ l)	Son hacim
dH ₂ O	11	
Primer F, 20 μ M	0.5	5 μ M
Primer R, 20 μ M	0.5	5 μ M
Master Mix, 5x	4	1 x
Total Volüm	16	+ 4 μ l cDNA

Tablo 3. 3: GZ PZR ile analiz öncesi hazırlanan reaksiyon

İşlem	Isı	Süre
Preinkübasyon	95°C	10 dk.
Kantitasyon	95°C	10 sn.
	62°C	5 sn.
	72°C	20 sn. (ölçüm)
Erime eğrisi analizi	95°C	0 sn.
	65°C	60 sn.
	95°C	0 sn.
Soğutma	40°C	30 sn.

Tablo 3. 4: GZ PZR işlemi

3.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Kontrol grubuna ait 6 sıçandan alınan doku örneklerinde yapılan immunohistokimyasal boyama ile normoperfüze dokuda DLL4'ün dağılımı incelendi. Cerrahi uygulanan gruptan farklı günlerde alınan doku örneklerinde ise, iskemik dokuda DLL4 dağılımı incelendi.

İmmünohistokimya; belli bir dokuda bulunan antijenlerin gösterilmesi için işaretlenmiş antikorların kullanılmasıdır. Belirli antijenler içeren doku kesiti, bu antijenlere karşı işaretlenmiş antikorlar içeren bir solüsyonda inkübe edildiği zaman, antikorlar spesifik olarak antijenlere bağlanır. Böylece antijen-antikor komplekslerinin yerleşimleri ya ışık ya da elektron mikroskopla gözlemlenebilir.

Farklı gruplardan alınan alınan biopsi örnekleri, %10 neutral buffered formalin içinde fikse edildi ve 24 saat sonra parafine gömüldü. Daha sonra 5 mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı ve 37 derecedeki etüvde bir gece bekletildi. Etüvden çıkarılan kesitler ilk önce saf ksilende 4 dakika, daha sonra %100 alkol ve ksilen karışımında (1:1 oranında) 5 dakika inkübe edilerek deparafinize edildi. Doku kesitlerini rehidrate etmek amacı ile 25 dakika boyunca etil alkol ile inkübasyon uygulandı. Rehidrate edilen doku kesitleri, 5 dakika boyunca TBS ile yıkandı ve citrate pH 6.0 tampon solüsyonu ile 20 dakika muamele edildi. Daha sonra tüm kesitlere mikrodalga fırında 20 dakika boyunca 400 watt gücünde ısı uygulandı. Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler, sıcak Citrate tampon içinde bırakılarak, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Böylece antijenler açığa çıkmış oldu. Tampondan çıkarılan doku kesitleri 10 dakika süre ile TBS ile yıkandı ve kesitlerin çevresi hidrofobik bir kalem ile çizildi. Doku kesitleri, protein blok (100 µl) ile 10 dakika boyunca muamele edildi. Daha sonra, 1/50 oranında dilüe edilen primer DLL4 antikorları ile 15 dakika inkübe edildi ve TBS ile yıkandı. 10 dakika boyunca hidrojen peroksit (100µl) ile muamele edilen

kesitlere, 100µl sekonder antikor (anti rabbit HRP konjuge özel primer) uygulandı ve 10 dakika bekletildi. Daha sonra, lamlara 100µl AEC substrat karışımı uygulandı. Son olarak, 20 dakika boyunca TBS ile yıkanan kesitlere Mayer's Hemotoksilen uygulandı ve mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi. Mikroskopik inceleme, 400 büyütme alanında ışık mikroskopu ile yapıldı



3.7. ELISA YÖNTEMİ İLE KANDA DLL4 ve VEGF TAYİNİ

Kontrol grubuna ait 6 sıçandan alınan kan örneklerinde yapılan ölçümler ile kanda bazal DLL4 ve VEGF seviyeleri tespit edildi. Cerrahi uygulanan gruptan farklı günlerde alınan kan örneklerinde ise, iskemiye bağlı olarak kandaki DLL4 ve VEGF değişiklikleri ortaya kondu.

Kan örnekleri, anestezi altındaki sıçanın kalbinden 22 gauge iğneli enjektör yardımı ile alındı. Ger bir sıçandan ortalama 5 cc kan alındı. Heparinli tüplere alınan örnekler, 4000 devir/dk hızında, 10 dakika boyunca santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum örnekleri, analiz gününe kadar -20°C'deki derin dondurucuda saklandı. Kanda DLL4 ve VEGF düzeylerinin belirlenmesi için, ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) yöntemi kullanıldı.

Kanda VEGF düzeyinin belirlenmesi için ticari olarak temin edilen sıçan VEGF ELISA kiti (Ray Biotech, Inc.) kullanıldı ve VEGF izoformunun analizi yapıldı. Kandaki DLL4 seviyelerini belirlemek adına ticari olarak temin edilen sıçan DLL4 ELISA kiti (Life Science, Inc) kullanıldı ve DLL4 izoformunun analizi yapıldı.

ELISA kiti tabakasının üzerindeki kuyucuklar, VEGF ve DLL4'e spesifik antikorlarla kaplıdır. Sıçan kanından elde edilen serum, kuyucuklara eklenir, böylece ortamda bulunan VEGF ve DLL4 molekülleri, kuyucuk duvarlarına yapışık antikorlarca tutulur. Ortama, VEGF ve DLL4'e karşı bir antikor olan biyotinle işaretlenmiş konjugat eklenir. Biyotin, dolayısıyla konjugat, VEGF ve DLL4 moleküllerine bağlanır ve sandviç yapısını oluşturur. Avidinle işaretli peroksidaz enzimi ortama eklenir ve sandviç yapısına bağlanır.

Peroksidazın substratı olan Tetrametilbenzidin'in (TMB) eklenmesiyle reaksiyon oluşur ve kuyucuklarda, örnek içindeki VEGF ve DLL4 konsantrasyonu ile doğru orantılı yoğunlukta mavi renk meydana getirir. Son basamakta kuyucuklara eklenen stop çözeltisi ortam pH'sını düşürerek peroksidazın katalizlediği reaksiyonu durdurur. Aynı zamanda kuyucuk içindeki çözeltinin rengini de maviden sarıya dönüştürür. Oluşan bu rengin yoğunluğu, tabaka okuyucu ile 450 nm'de ölçülür. Mevcut olan VEGF ve DLL4'ün düzeyleri pg/dl cinsinden belirlenir.

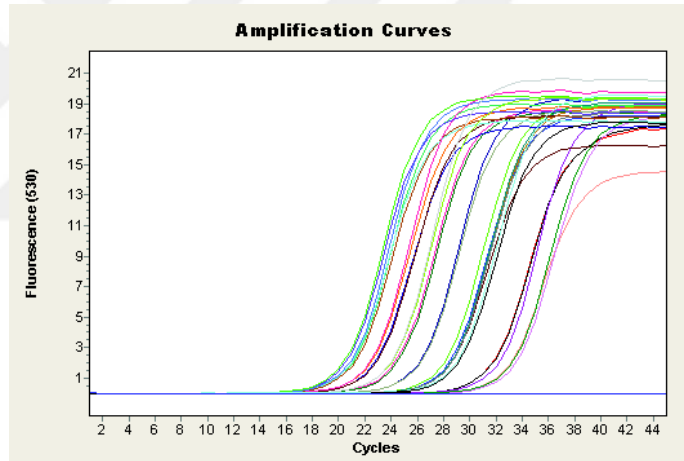
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyumu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Varyansların homojenliği ise Levene testi ile analiz edildi. Parametrik testlerin varsayımlarını sağlayan kanda VEGF değişkeni bakımından bağımsız grup ortalamalarının karşılaştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey HSD testi kullanıldı. VEGF ve DLL4 gen ifadenmesi bakımından grup varyanslarının homojenliği ön şartının yerine gelmediği görüldüğünden söz konusu değişkenlere ilişkin bağımsız grup ortancalarının karşılaştırılması amacıyla Kruskal-Wallis testi ve ardından çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Dunn testi kullanıldı. Grup varyansları homojen olmayan kanda DLL4 değişkeni bakımından iki grup ortancasının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyonlar normal dağılım ön şartı yerine geldiğinden Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirildi. İstatistik analiz sonuçları, ortalama \pm standart sapma, ortanca değer ve en küçük-en büyük değerler olarak ifade edildi. $p < 0.05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri setinin analizinde SPSS 17.0 istatistik paket programı kullanıldı (SPSS Ver. 17.0, SSPS Inc, Chicago IL, USA).

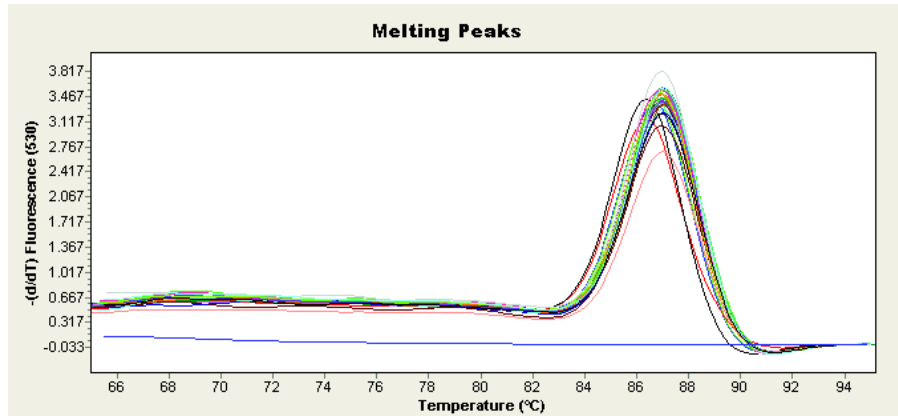
IV. Bulgular

4.1. GEN İFADELENMESİ

Her bir örnekten elde edilen VEGF ve DLL4 ile ilgili cDNA'lar ampilifiye edildikten sonra (Şekil 4.1), SYBR Green I boyası kullanılarak semikantitatif GZ PZR yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen floresansın istenen hedef bölgeye ait olup olmadığını anlamak için "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmıştır. (Şekil 4.2)

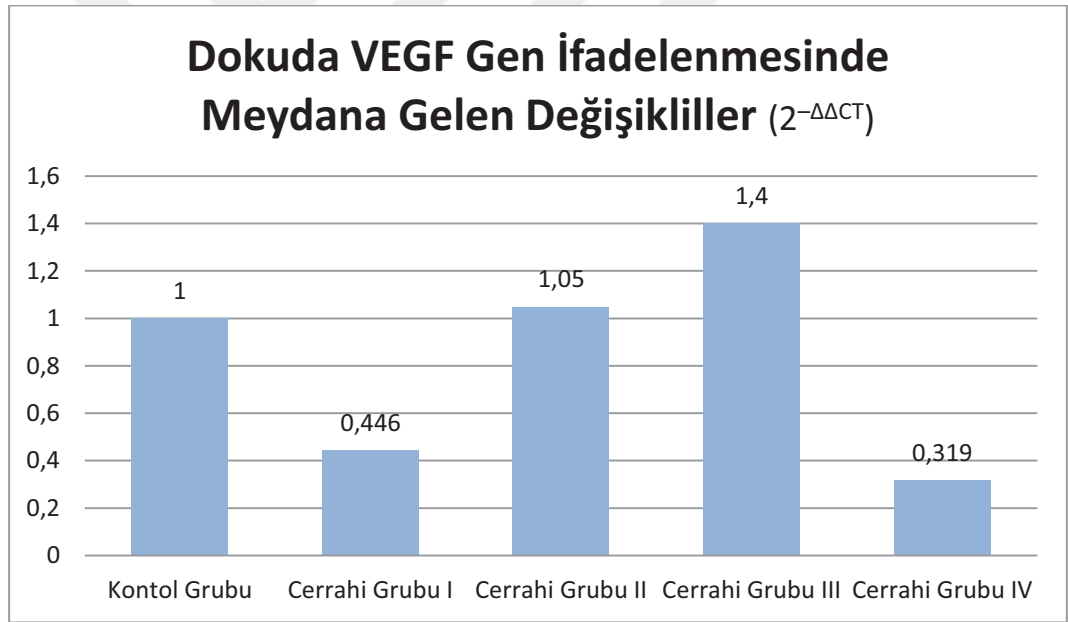


Şekil 4. 1: Amplifikasyon Eğrisi



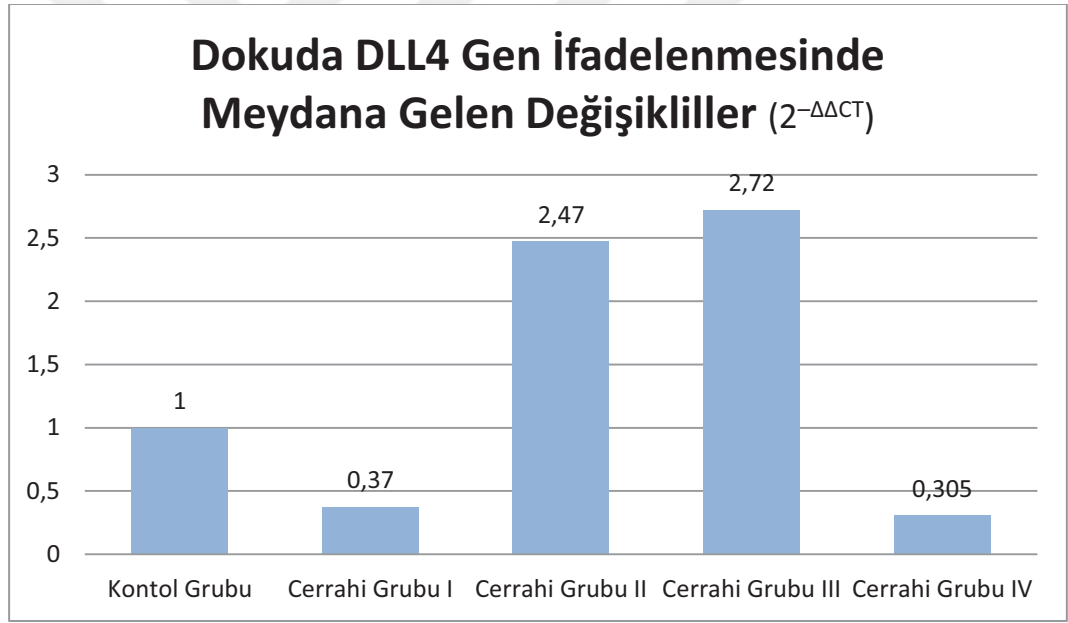
Şekil 4. 2: Erime Eğrisi

VEGF genlerinin ifadenme düzeyleri, housekeeping gen olarak β -aktin kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol grubuna ait iskemik olmayan doku ile karşılaştırıldığında, iskemik dokuda VEGF transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün %66 oranında azaldığı gözlenmiştir. Cerrahi sonrası 3. gün bazal seviyelere tekrar ulaştıktan sonra, en yüksek seviyesine %40'luk artış ile cerrahi sonrası beşinci gün ulaştığını görmekteyiz. Cerrahi sonrası onuncu gün, ifadenme bazal seviyeye göre %68 azalmaktadır. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$).



Şekil 4. 3: Dokuda VEGF gen ifadenmesi

DLL4 genlerinin ifadenme düzeyleri, housekeeping gen olarak β -aktin kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrol grubuna ait iskemik olmayan doku ile karşılaştırıldığında, iskemik dokuda DLL4 transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün % 63 oranında azaldığı gözlenmiştir. Cerrahi sonrası 3. Gün %147, 5. Gün ise %172 oranında artış saptanmıştır. Onuncu günde, bazal seviyelere göre %70 azalma saptanmıştır. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$)



Şekil 4. 4: Dokuda DLL4 gen İfadenmesi

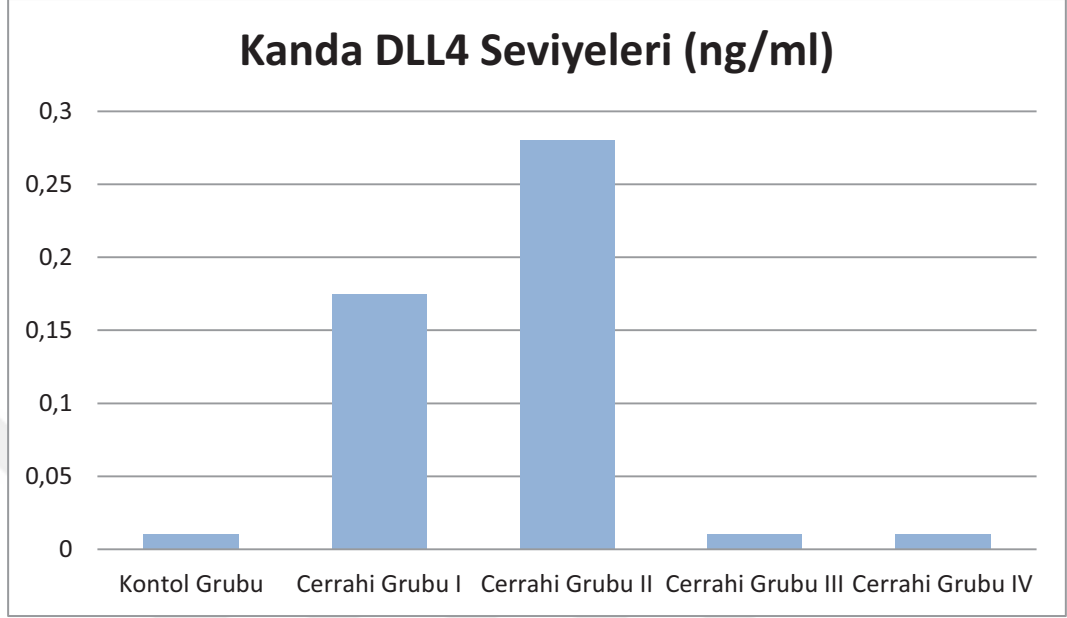
4.2. KANDA DLL4 VE VEGF SEVİYELERİ

Kanda ölçülen VEGF seviyelerinin ortalamalarına bakıldığında; cerrahi grubu I: 0,37 pg/ml, cerrahi grubu II: 0,63 pg/ml, cerrahi grubu III: 0,25 pg/ml, cerrahi grubu IV: 0,19 pg/ml ve kontrol grubunda: 0,09 pg/ml olarak bulundu. Gruplar arası fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p < 0.01$)

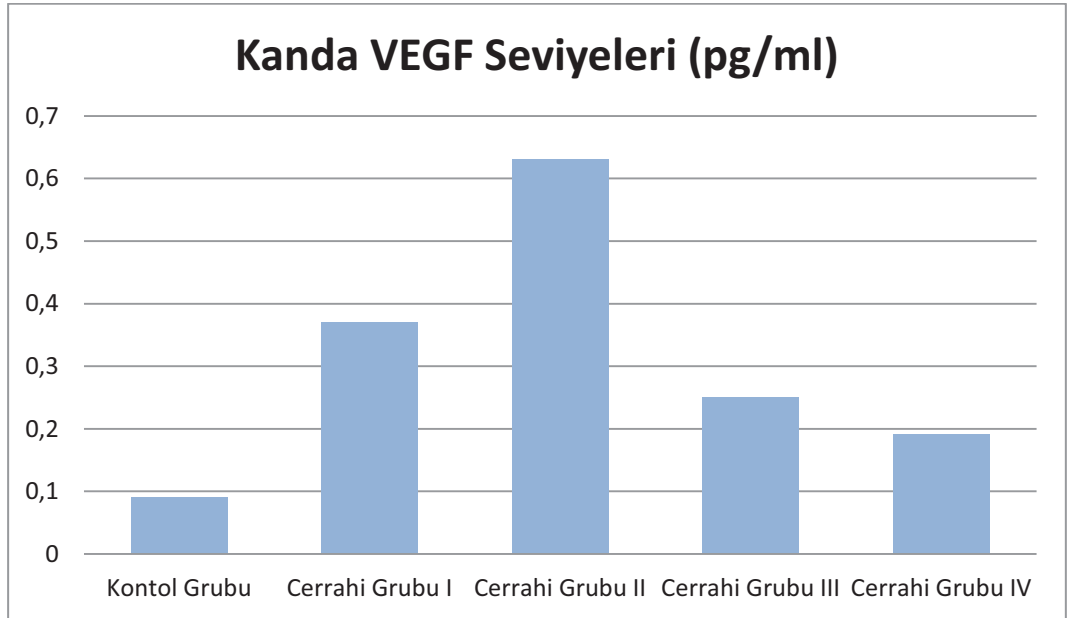
Kanda ölçülen DLL4 seviyelerinin ortalamalarına bakıldığında; cerrahi grubu I: 0,175 ng/ml ve cerrahi grubu II: 0,28 pg/ml olarak bulundu. Cerrahi grubu III ve IV ile kontrol grubundan alınan örneklerde düşük seviyeye bağlı olarak ölçüm yapılamadı. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$)

	VEGF	DLL4
Kontrol Grubu	0.15	N.D
	0.12	N.D
	0.09	N.D
	0.08	N.D
	0.08	N.D
	0.02	N.D
Cerrahi Grubu I	0.48	0.20
	0.34	0.18
	0.32	0.16
	0.37	0.17
	0.39	0.16
	0.33	0.18
Cerrahi Grubu II	0.66	0.25
	0.60	0.37
	0.66	0.22
	0.67	0.28
	0.70	0.34
	0.50	0.25
Cerrahi Grubu III	0.25	N.D
	0.23	N.D
	0.28	N.D
	0.27	N.D
	0.24	N.D
	0.25	N.D
Cerrahi Grubu IV	0.25	N.D
	0.22	N.D
	0.10	N.D
	0.23	N.D
	0.18	N.D
	0.18	N.D

Tablo 4. 1: Kanda VEGF ve DLL4 protein seviyeleri



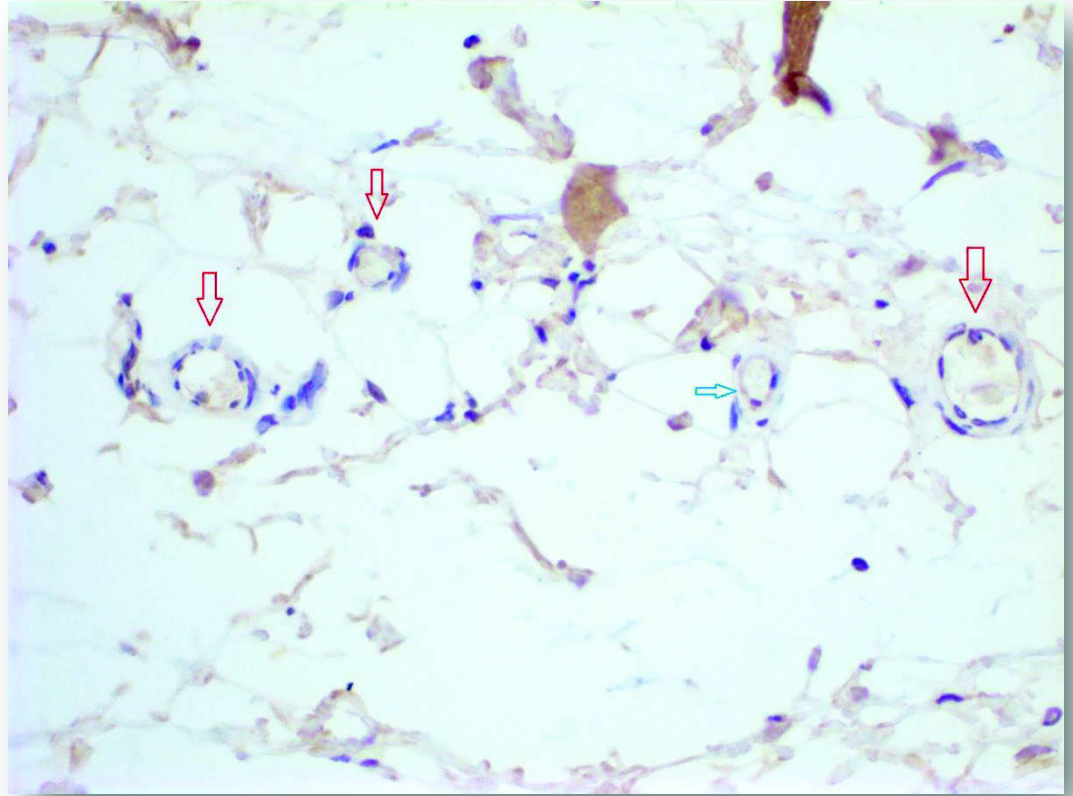
Şekil 4. 5: Kanda DLL4 seviyeleri



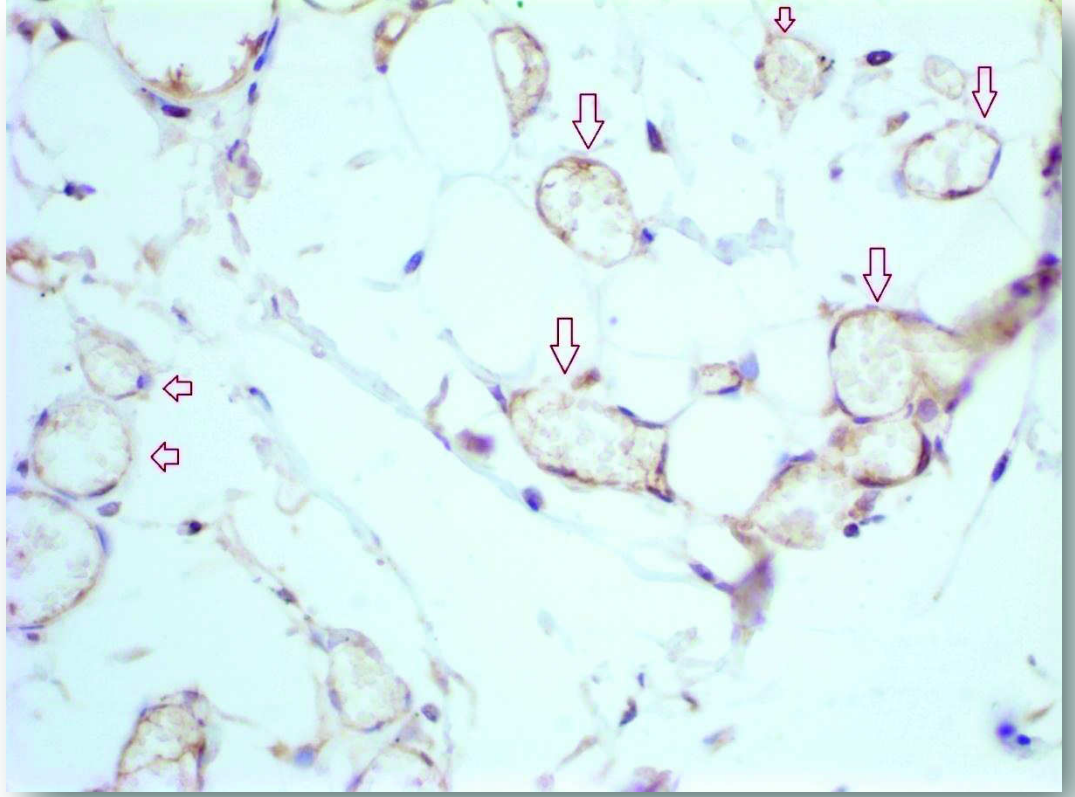
Şekil 4. 6: Kanda VEGF seviyeleri

4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

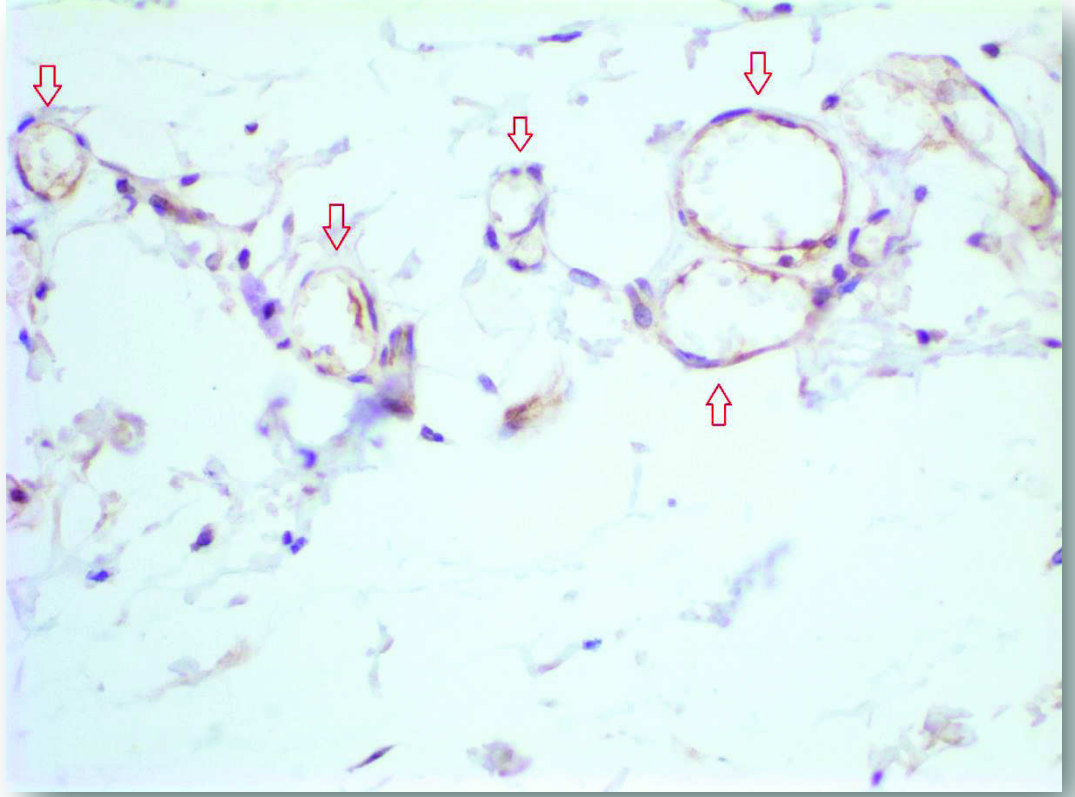
DLL4 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, kontrol grubunda bazı endotelial hücrelerde minimal sitoplazmik granüler boyanma gözlemlendi (Şekil 4.7). Cerrahi uygulanan gruplarda kapiller proliferasyon alanlarında daha belirgin olmak üzere, endotelial hücrelerde değişken şiddetlerde yaygın pozitif reaksiyon gözlemlendi. Cerrahi grupları arası boyanma şiddetinde farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11)



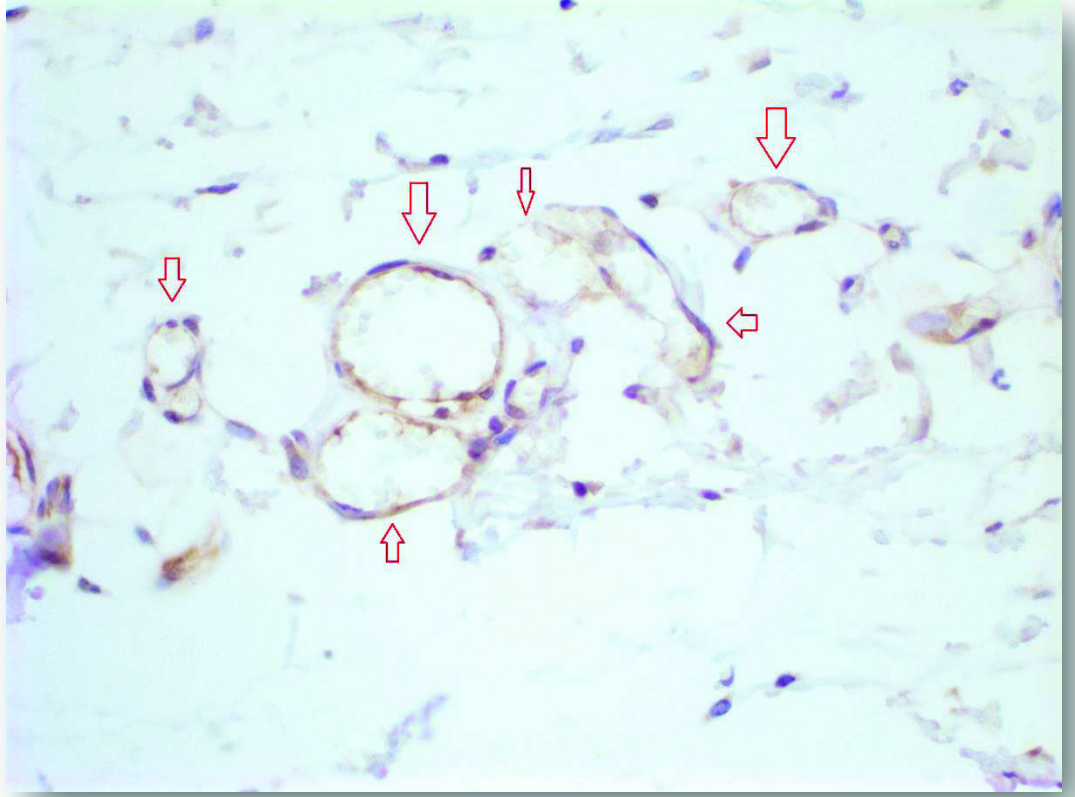
Şekil 4. 7: Kontrol grubunda serek vasküler yapılar, çoğu endotel hücrelerinde boyanma olmazken (kırmızı ok), bazı endotelial hücrelerdeki minimal granüler sitoplazmik pozitif reaksiyon (mavi ok)



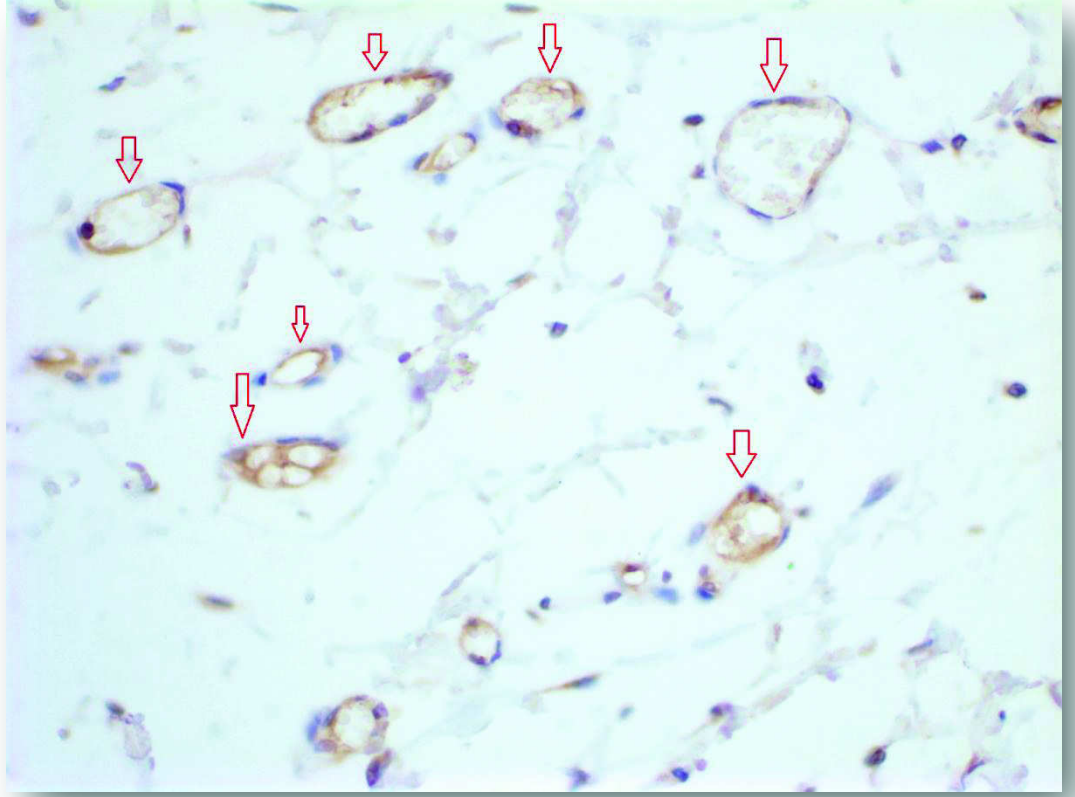
Şekil 4. 8: Cerrahi grubu I'de kapiller proliferasyon odaklarında endotelial hücrelerin hemen hepsinde çeşitli derecelerde sitoplazmik pozitif reaksiyon (kırmızı ok). (DLL4, X400)



Şekil 4. 9: Cerrahi grubu II'de kapiller proliferasyon odaklarında endotelial hücrelerin hemen hepsinde çeşitli derecelerde sitoplazmik pozitif reaksiyon (kırmızı ok). (DLL4, X400)



Şekil 4. 10: Cerrahi grubu III'te kapiller proliferasyon odaklarında endotelial hücrelerin hemen hepsinde çeşitli derecelerde sitoplazmik pozitif reaksiyon (kırmızı ok). (DLL4, X400)



Şekil 4. 11: Cerrahi grubu IV'te kapiller proliferasyon odaklarında endotelial hücrelerin hemen hepsinde çeşitli derecelerde sitoplazmik pozitif reaksiyon (kırmızı ok). (DLL4, X400)

Gruplar		Kanda VEGF	Kanda DLL4	VEGF Transkripsiyonu	DLL4 Transkripsiyonu
Kontrol Grubu	Ortalama	0.09		1	1
	Std. Deviasyon	0.04386		0	0
	Ortalama	0.0850		1	1
	Minimum	0.02		1	1
	Maximum	0.15		1	1
	P	< 0.01		< 0.01	< 0.01
Cerrahi Grubu I	Ortalama	0.6317	0.2850	0.44	0.37
	Std. Deviasyon	0.07223	0.05822	0.44721	0.042
	Ortalama	0.66	0.2650	0.44	037
	Minimum	0.50	0.22	0.39	032
	Maximum	0.70	0.37	0.49	042
	P			< 0.01	< 0.01
Cerrahi Grubu II	Ortalama	0.3717	0.1750	1.05167	2.47
	Std. Deviasyon	0.5913	0.01517	0.47081	0.059
	Ortalama	0.3550	0.1750	1.05	2.47
	Minimum	0.32	0.16	0.980	2.4
	Maximum	0.48	0.20	1.120	2.540
	P	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Cerrahi Grubu III	Ortalama	0.2533		1.46	2.72
	Std. Deviasyon	0.01862		0.0787	0.055
	Ortalama	0.25		1.46	2.72
	Minimum	0.23		1.37	2.650
	Maximum	0.28		1.550	2.790
	P	< 0.01		< 0.01	< 0.01
Cerrahi Grubu IV	Ortalama	0.1933		0.32	0.305
	Std. Deviasyon	0.05354		0.42426	0.018
	Ortalama	0.2		0.32	0.305
	Minimum	0.1		0.27	0.285
	Maximum	0.25		0.37	0.325
	P	< 0.01		< 0.01	< 0.01
Toplam	Ortalama	0.3080	0.2300	0.85433	1.37
	Std. Deviasyon	0.19512	0.07032	0430	1.04
	Ortalama	0.25	0.21	1	1
	Minimum	0.02	0.16	0.27	0.285
	Maximum	0.70	0.37	1.550	2.790

Tablo 4. 2: İstatiksel Analizin Özeti

V. Tartışma

Yeni damar oluşumu; vücutta embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olarak veya tümör dokusunda olduğu gibi patolojik bir süreç kapsamında meydana gelmektedir. Embriyonik dönemde meydana gelen damarlanma, genetik olarak programlanmıştır. Embriyonik dönemi takiben yeni damar oluşumu, dinamik bir işlem olup organizmanın metabolik, immünolojik ve büyüme gereksinimlerine cevap verecek biçimde gerçekleşmektedir. Bu dönemde, yeni damar oluşumu için en önemli uyarının hipoksi olduğu düşünülmektedir.³⁻⁵

Yeni damar oluşumu ve olgunlaşması, endotel hücrelerindeki birçok reseptörün aktive edilmesini gerektiren kompleks ve koordine bir işlemdir.⁵⁶ Bilinen tüm anjiyogenik faktörler içinde VEGF, yeni damar oluşumu esnasında en önemli rolü oynayan mediatördür.⁵⁷ VEGF, endotel hücrelerinin in-vivo ve in-vitro ortamlarda, büyümesini ve çoğalmasını sağlar.⁷⁸⁻⁸⁰ Endotel hücre göçünde VEGF, çok önemli bir uyarandır.^{78,80,81} İn-vitro modellerde endotel hücrelerini uyarak kapiller benzeri yapılar oluşturduğu belirlenmiştir.⁸² İn-vivo modellerde, anjiyogenik cevabı artırır.⁸³ Farelerin bazı dokularında lenfanjiyogenez meydana getirdiği gözlenmiştir.⁸⁴ VEGF'nin, kültüre edilen endotel hücrelerinde antiapoptotik proteinlerin sentezlenmesine yol açtığı belirlenmiştir.⁸⁵ VEGF'nin yokluğunda endotel hücrelerinin apoptoza gittiği yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.^{86,87} VEGF; endotel hücrelerini uyarak, proteolitik enzimler salgılamalarını sağlar.^{78,80,81} Bu durum, hücre dışı matrix'in yıkılmasında ve yeni damar oluşumunun ilerlemesinde önemli bir basamaktır. VEGF sentezi, hipoksi ve iskemi durumlarında belirgin bir biçimde artmaktadır.^{81,95,96} VEGF mRNA ekspresyonu, kısmi oksijen basıncının düşük olduğu patofizyolojik durumlarda artar.⁹⁷ Bu cevabın düzenlenmesinde, HIF-1 molekülünün anahtar rol oynadığı bilinmektedir.⁹⁸

Çentik Sinyal yolağı, embriyonik angiogenez esnasında primitif vasküler ağın organize hiyerarşik bir ağa dönüşmesinde kritik rol oynamaktadır. Altta yatan temel mekanizma, VEGF'nin dallandırıcı etkisinin antagonize edilmesidir. DLL4 yokluğunda, dallanma kontrolsüz bir biçimde devam edecek ve ilgili dokunun gereksinimleri ile uyumsuz bir damar ağı oluşacaktır. Embriyonik dönem içinde yolağın aksaması, ciddi damarsal gelişim bozukluklarına yol açmaktadır. Hellström tarafından yapılan çalışmada, fare embriyosunun dallanmakta olan retinal arterlerinde DLL4 artışı saptanmıştır.⁶ Siekmann zebra balığı embriyosunda benzer sonuçlar elde etmiştir.¹³⁹ Embriyonik dönemde bu yolağın inhibisyonu ciddi damarsal gelişim bozukluklarına yol açmaktadır. DLL4 geni mutant sıçan embriyolarında ağır damarsal gelişim bozukluklarına bağlı ölüm görülmektedir.^{115,116} Aynı şekilde Çentik 1 reseptör geninde mutasyon olan sıçan embriyolarının plasentası ve embriyonun kendisinde damarsal gelişim bozuklukları gözlenmekte ve ölüm ile sonuçlanmaktadır.¹¹⁷⁻¹²¹ Bu gelişim bozukluklarındaki temel problem oluşan damarlardaki organizasyon bozukluğudur.

Embriyonik dönemdeki damarlanmanın dışında, Çentik sinyal yolağı kanser dokusunun damarlanmasında da aktif bir rol üstlenmektedir. Büyümekte olan kanser dokusunda, VEGF benzeri proangiojenik faktörler devamlı bir biçimde sentezlenmekte ve yeni damar oluşumuna yol açmaktadır.¹⁴⁰ Yüksek seviyedeki bu faktörlere bağlı olarak, Çentik sinyal yolağı aktive olmaktadır.¹⁴¹ İnsanlarda meme karsinomu, böbrek karsinomu ve Kaposi sarkom gibi solid tümörlerin vasküler komponentinde, Çentik sinyal yolağının aktive olduğu saptanmıştır.^{141,142}

Postembriyonik dönemde yeni damar oluşumunun başlıca tetikleyicisi iskemidir. İskemiye cevap olarak oluşan damarlanmanın mekanizması, embriyonik veya kanser dokusundaki damarlanmadan farklıdır. Dolayısı ile, Çentik sinyal yolağının davranış biçimide farklılık gösterebilmektedir. İskemiye ikincil gelişen damarlanma esnasında Çentik sinyal yolağının rol alıp almadığı ve hangi biçimde etki ettiği halen bilinmemektedir.

Çalışmamızda kontrol grubundan elde edilen iskemik olmayan dokular ile karşılaştırıldığında, cerrahi olarak iskemiye maruz kalan dokularda VEGF transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün azaldığını görmekteyiz. Erken dönemdeki bu azalma, akut iskemiye ikincil gelişen hücrese seviyedeki hasara bağlı olabilmektedir. Deney esnasında oluşturulan iskemi nekroza yol açacak kritik düzeyde olmadığından, hücre rejenerasyonu gelişecek ve iskemiye cevap olarak VEGF transkripsiyonu artacaktır. Bu durum, çalışmamızda cerrahi sonrası 3. Gün tekrar bazal seviyelere dönen ve 5. Gün en yüksek seviyelerine ulaşan transkripsiyon düzeyleri ile gösterilmektedir. Daha önce yapılan benzer çalışmalarda, VEGF transkripsiyon seviyelerinde iskemi sonrası herhangi bir azalma olmadığı ve 5. günden daha erken dönemlerde en yüksek seviyelere ulaşıldığı saptanmıştır.^{143,144} Bu farklılık, cerrahi esnasında oluşturulan iskemi düzeyi ile ilişkili olabilmektedir. Ayrıca genetik analiz esnasında bazı teknik farklılıklar söz konusu olabilmektedir.

Kanda saptanan VEGF seviyelerine bakacak olursak, dokudaki VEGF transkripsiyon seviyelerinden farklı olarak cerrahi sonrası birinci günden itibaren yükseldiğini görmekteyiz. Bu durum RNA moleküllerinin proteine kıyasla iskemiye daha dayanıksız olması ile açıklanabilmektedir. İskemik dokuda RNA molekülleri hasarlanırken, ürünleri olan proteinler devamlılık göstermekte ve kana karışmaktadır. Çalışmamızda, VEGF proteinlerinin en yüksek seviyelerine cerrahi sonrası üçüncü gün ulaştığını görmekteyiz. Bu yükselmeyi takiben, cerrahi sonrası 5. gün bazal seviyelere dönmekte. Bu durum VEGF'nin 12 saatlik kısa yarılanma ömrü ve dokuda VEGF transkripsiyonundaki azalma ile açıklanabilmektedir.

Kontrol grubundan elde edilen iskemik olmayan dokular ile karşılaştırıldığında, cerrahi olarak iskemiye maruz kalan dokularda DLL4 transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün azaldığını görmekteyiz. DLL4 sentezinin başlıca tetikleyicisi VEGF olduğundan, akut dönemdeki bu azalmanın eş zamanlı VEGF transkripsiyonundaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde, VEGF transkripsiyonu ile paralel bir biçimde DLL4 transkripsiyonu 3. Günden itibaren yükselmeye başlamakta ve en yüksek seviyesine cerrahi sonrası 5. Gün ulaşmakta. Bu bulgular, Çentik sinyal yolağının iskemi ile tetiklenen damarlanma esnasında VEGF ile paralel bir biçimde aktive olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubundaki sıçanlardan alınan kan örneklerinde DLL4 seviyeleri ölçülemeyecek kadar düşük saptandı. Cerrahi uygulanan sıçanlardan alınan kan örneklerinde ise, cerrahi sonrası birinci ve üçüncü günler arası yükselme saptanmıştır. DLL4, transmembran bir protein olarak sentezlenmekte ve etkisini reseptörü içeren komşu hücre ile temas ederek göstermekte. Bu durum, dokudaki artışa rağmen kandaki artışın neden belirgin olmadığını açıklamaktadır. 5. günden sonra kan seviyelerindeki akut düşme DLL4 yarılanma ömrünün VEGF'ye göre daha kısa olduğunu göstermektedir.

DLL4 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, kontrol grubunda bazı endotel hücrelerde minimal sitoplazmik granüler boyanma gözlemlendi. Bu durum postembriyonik dönemde fizyolojik anjiyogenez esnasında Çentik sinyal yolağının bazal bir seviyede aktive olduğunu göstermektedir. Cerrahi uygulanan gruplarda kapiller proliferasyon alanlarında daha belirgin olmak üzere, endotel hücrelerde değişken şiddetlerde yaygın pozitif reaksiyon gözlemlendi. Boyanmanın damarsal proliferasyon alanlarında ağırlıklı olması DLL4 proteinlerinin başlıca dallanmakta olan endotel hücrelerinde sentezlendiğini göstermektedir. Cerrahi uygulanan gruplar arası boyanma şiddetinde farklılık gözlemlenmedi. Cerrahi sonrası 10. Gün dokuda DLL4 ifadenmesindeki azalmaya karşın, ürünü olan DLL4 proteinleri dokuda varlık göstermektedir.

İskemik dokuda, VEGF ifadenmesine paralel bir şekilde DLL4 ifadenmesinde gösterilen artış, iskemiyeye ikincil gelişen damarlanma esnasında Çentik sinyal yolağının rol aldığını göstermektedir. Normoperfüze dokuda VEGF ve DLL4 bazal seviyelerde sentezlenirken iskemik koşullarda her iki proteinin sentezi artmaktadır. İskemik dokuda VEGF yeni damar oluşumu ve dallanmayı tetiklerken, DLL4 bu dallanmayı belirli bir seviyeye ulaşıldıktan sonra baskılamakta ve ilgili dokunun gereksinimleri ile uyumlu bir damar ağı oluşumuna yol açmaktadır.

Çentik sinyal yolağının damarlanma üzerindeki negatif düzenleyici etkisi, kanser tedavisinde yeni bir ışık olmuştur. Çentik sinyal yolağının tümör dokusunda baskılanması ile damarlarda kontrolsüz bir dallanma artışı meydana gelmektedir.^{6,145-147} Alta yatan temel mekanizma, VEGF'nin dallandırıcı etkisine karşı Çentik yolağı ile sağlanan negatif geri dönüşüm mekanizmasının ortadan kalkmasıdır. Tümör dokusundaki kontrolsüz dallanma artışı, tümör büyümesine katkı sağlamadığı gibi, tümörün gerilemesine neden olmaktadır.^{6,145-147} Bunun

nedeni, oluşan damarlardaki olgunlaşma bozukluğudur. Yapılan incelemelerde yeni oluşan bu damarların bir çoğunda lümen oluşumu gözlenmemiştir.

Çentik sinyal yolağı ile ilgili literatür incelendiğinde, genel yaklaşım bu yolağın inhibisyonu ile elde edilecek dallanma artışına rağmen doku perfüzyonunda bir azalma olacağı yönündedir. Bu yaklaşımın nedeni yolağın inhibisyonu ile elde edilen anti tümör etkidir. Yalnız iskemiye ikincil oluşan damarların yapısı tümör dokusunda oluşan damarlardan farklıdır. Tümör dokusunda oluşan damarlar, anormal yapıda olup çoğu zaman tümör dokusu ile invazedir. Dolayısı ile tümör dokusunda Çentik sinyal yolağının inhibisyonu ile elde edilen etkiler normal dokuda yapılan inhibisyondan farklı olabilir. Ayrıca tümör dokusunda yapılan DLL4 inhibisyonları yüksek doz soluble DLL4 proteini kullanılarak yapılmıştır.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Daha düşük dozlarda ile yapılan DLL4 inhibisyonu ile fonksiyonel bir damarlanma artışı elde etmek mümkün olabilmektedir. Düşük doz ile yapılan DLL4 inhibisyonunun, yara dokusunda fonksiyonel bir damarlanma artışına yol açarak rejenerasyonu hızlandırdığı saptanmıştır.¹⁴⁸

Bir önkoşullama yöntemi olan cerrahi geciktirme (delay) işlemi, flep sağkalımını klinik olarak arttırdığı defalarca gösterilen tek gerçekçi yöntemdir. Bu yöntemin klinik etkinliğini gösteren onca veriye rağmen etki mekanizması halen net bir biçimde ortaya konamamıştır. Bu amaçla birçok deneysel ve klinik çalışma yapılmış olup çok farklı teoriler ortaya atılmıştır. Tüm bu teorilerin ortak noktası, meydana gelen değişikliklerin iskemiye bağlı olmasıdır.⁷⁻⁹

Geciktirme ile ilgili ilk deneysel çalışma 1969 yılında Milton tarafından bir domuz modelinde yapılmıştır.¹⁴⁹ Geciktirme işlemi uygulanan bipediküllü fleplerin hayatiyetinde artış saptanmış ve optimum etki için gerekli süre 2 hafta olarak belirlenmiştir. 1981 yılında Pearl tarafından yapılan çalışmada hiperadrenerjik ortam teorisi ortaya atılmıştır. Bu teoriye göre cerrahi geciktirme esnasında, sempatik sinir uçlarının kesilmesi ile noradrenalin salınmakta ve hiperadrenerjik bir ortam oluşmaktadır. Bu hiperadrenerjik ortam, ortalama 30 saat sürmekte ve prekapiller sfinkterlerde vazokonstrüksiyona yol açarak flepte iskemiye neden olmaktadır. Geciktirmenin ikinci aşamasında ise, flebin kaldırılması ile birlikte daha önce sempatektomi ile elimine olan norepinefrin salınımı olmayacak ve flep damarlarında göreceli bir vazodilatasyon meydana gelecektir.¹⁵⁰ Finseth ve Cutting tarafından yapılan çalışmada, sempatektomiye takiben flepte kan akımının arttığı gösterilmiştir.^{151,152} Yapılan değişik çalışmalarda geciktirme amacı ile kaldırılan fleplerde bu geçici vazospastik dönemi takiben göreceli bir vazodilatasyon meydana geldiği gösterilmiştir.¹⁵³⁻¹⁶²

1992 yılında Callegari ve Taylor tarafından yapılan çalışmada geciktirme sonrası choke anastomozlarda meydana gelen değişikliklere vurgu yapılmıştır.^{163,164} Normoperfüze fleplerde kapalı olan bu anastomozlar geciktirme ile birlikte sempatektomiden bağımsız bir biçimde genişlemekte ve gerçek anastomozlara dönüşmektedir. Morris, bu olayın 48-72 saat içinde meydana geldiğini göstermiştir.¹⁵⁸

Geciktirilen fleplerin araşidonik asit metabolizmasında meydana gelen değişiklikler, 1985 yılında Murphy tarafından ortaya konmuştur.¹⁶⁵ Buna göre cerrahi geciktirme işlemi takiben, tromboxan gibi vazokonstrüktör ajanların seviyesinde artış meydana gelmektedir. Bir sonraki aşamada, flebin kaldırılması ile bu ajanlara karşı bir duyarsızlaşma oluşmuş olmaktadır. Böylece flep damarlarında göreceli bir vazodilatasyon meydana gelmektedir.

Cerrahi geciktirme ile oluşturulan iskemi, hem vaskülogenezisi hemde anjiyogenezisi tetikleyerek yeni damar oluşumuna yol açmaktadır. 2004 yılında Wong ve Lineaweaver tarafından yapılan çalışmalarda, geciktirme işlemini takiben basic fibroblast growth factor (bFGF) ve vascular endothelial growth factor (VEGF) gibi anjiyogenik büyüme faktörlerinin sentezinde artış saptanmıştır.^{143,166} Carroll yaptığı çalışmada, bFGF ve PDGF uygulaması ile flep hayatietinde artış olduğunu gözlemlemiştir.^{167,168}

Endotelial öncül hücrelerin keşfi postnatal dönemde de vaskülogenezin dinamik bir biçimde devam ettiğini göstermektedir. 2005 yılında, Tepper bu öncül hücreleri geciktirme işlemi uygulanan flep dokusundan izole etmiştir.¹⁶⁹ Öncül hücrelerin aktivasyonu hipoksiye bağlı olarak salınan VEGF benzeri sitokinlere bağlıdır. Yapılan farklı çalışmalarda, endotelial öncül hücre transplantasyonu ile flep neovaskülarizasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir.¹⁷⁰⁻¹⁷²

Bu çalışmada iskemik flep modelinde Çentik sinyal yolağının aktive olduğunu göstermemiz ile, cerrahi geciktirme uygulanan fleplerde yeni damar oluşumu esnasında etkili olan bir mekanizmayı ortaya koymuş olmaktadır. Bu yolağın farmakolojik olarak uygun dozlarda inhibisyonu ile teorik olarak cerrahi geciktirme uygulanan iskemik dokuda VEGF'nin dallandırıcı etkisini potansiyelize edebiliriz. Böylece daha etkili bir geciktirme işlemi gerçekleştirmiş oluruz. Ayrıca, normoperfüze dokuda bu yolak minimal düzeylerde etkili olduğundan inhibisyonu selektif olarak iskemik flep dokusunda olacaktır.

Geciktirme işlemine ek olarak, Çentik yolağının inhibisyonu iskemik dokularda pahalı büyüme faktörlerine alternatif bir proanjiyogenik tedavi yöntemi olarak kullanılabilir. Bu amaçla, Çentik sinyal yolağı ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



VI. Sonuç

Bu çalışmada, İskemik dokuda VEGF ifadenmesine paralel bir şekilde DLL4 ifadenmesinde gösterilen artış, iskemiye ikincil gelişen damarlanma esnasında Çentik sinyal yolağının rol aldığını göstermektedir. Çentik yolağının bu süreçteki muhtemel rolü VEGF'nin dallandırıcı etkisini baskılamaktır. Böylece ilgili dokunun gereksinimleri ile uyumlu bir damar ağı oluşacaktır.

Cerrahi geciktirme gibi iskemiye ikincil damarlanmanın oluştuğu bir süreçte bu yolağın farmakolojik olarak uygun dozlarda inhibisyonu ile teorik olarak iskemik dokuda VEGF'nin dallandırıcı etkisini potansiyelize edebiliriz. Böylece daha etkili bir geciktirme işlemi gerçekleştirmiş oluruz. Geciktirme işlemine ek olarak, Çentik yolağının inhibisyonu iskemik dokularda pahalı büyüme faktörlerine alternatif bir proanjyogenik tedavi yöntemi olarak kullanılabilir.

VII. Özet

Embriyonik dönemi takiben yeni damar oluşumu, dinamik bir işlem olup organizmanın metabolik, immünolojik ve büyüme gereksinimlerine cevap verecek biçimde gerçekleşmektedir. Doğum sonrası dönemde, yeni damar oluşumu için en önemli uyarının hipoksi olduğu düşünülmektedir. Çentik sinyal yolağı hücreler arası iletişimi sağlayarak, hücrelerin büyümesi, farklılaşması ve özelleşmesi açısından önemli bir role sahiptir. İşlevsel bir Çentik sinyal yolağı, normal damar gelişimi açısından gereklidir. Embriyonik dönemde damarın arter veya ven yönünde farklılaşmasını sağladığı gibi, oluşan damar ağının işlevselliği açısından dallanma işleminde dengeliyici bir rol üstlenmektedir. Bu denge, dallanan damarın en ucundaki endotel hücrelerinde sentezlenen DLL4 ile sağlanmaktadır. Bu moleküller ana damar endoteli üzerindeki çentik reseptörleri ile etkileşime girerek vascular endothelial growth factor receptor 2 sentezini baskılamaktadır. Böylece, vascular endothelial growth factor'un dallandırıcı etkisi baskılanmaktadır. Postembriyonik dönemde, İskemiye ikincil gelişen damarlanma esnasında Çentik sinyal yolağının etkisi halen bilinmemektedir. Bu çalışmada, sıçanda oluşturulan iskemi modelinde Çentik sinyal yolağının etkili olup olmadığı sorusuna cevap aramaktayız.

Çalışmada 30 adet erkek “Sprague Dawley” cinsi sıçan kullanıldı. İskemi modeli olarak, sırt bölgesinde kaudal bazlı random paternli deri flebi (modifiye McFarlane flebi) tercih edildi. Sıçanlar 2 gruba ayrıldı. Grup I (kontrol grubu): bu grupta yer alan 6 sıçana herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. Cerrahi grubunda kullanılan McFarlane flebinin distal kısmına denk gelen bölgeden doku biopsisi yapıldı. Kalp içinden kan örnekleme yapıldıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Grup II (cerrahi grubu): Bu grupta yer alan 24 sıçandan McFarlane dorsal deri flebi kaldırıldı ve tekrar yerine dikildi. Doku ve kan örneklemeleri ilk 6 sıçandan

cerrahi sonrası 1. gün, ikinci 6 sıçandan cerrahi sonrası 3. gün, üçüncü 6 sıçandan cerrahi sonrası 5. gün ve son 6 sıçandan cerrahi sonrası onuncu gün yapıldı. Örneklemeye işlemini takiben sıçanlar sakrifiye edildi. Alınan kan ve doku örneklerinde incelenen parametreler: ELISA yöntemi ile kanda DLL4 ve VEGF seviyeleri, GZ - PZR yöntemi ile dokuda DLL4 ve VEGF ifadenmesi ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile dokuda DLL4 proteinin tayini.

Kontrol grubuna ait iskemik olmayan doku ile karşılaştırıldığında, iskemik dokuda VEGF transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün %66 oranında azaldığı gözlenmiştir. Cerrahi sonrası 3. gün bazal seviyelere tekrar ulaştıktan sonra, en yüksek seviyesine %40'lık artış ile cerrahi sonrası beşinci gün ulaştığını görmekteyiz. Cerrahi sonrası onuncu gün, ifadenme bazal seviyeye göre %68 azalmaktadır. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). DLL4 ifadenmesine bakacak olursak, kontrol grubundan elde edilen düzeylere göre iskemik dokuda DLL4 transkripsiyonunun cerrahi sonrası birinci gün % 63 oranında azaldığı gözlenmiştir. Cerrahi sonrası 3. Gün %147, 5. Gün ise %172 artış saptanmıştır. Onuncu günde, bazal seviyelere göre %70 azalma saptanmıştır. Gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.01$). Kanda ölçülen VEGF seviyelerinin ortalamalarına bakıldığında; kontrol grubu: 0,09 pg/ml, cerrahi grubu I: 0,37 pg/ml, cerrahi grubu II: 0,63 pg/ml, cerrahi grubu III: 0,25 pg/ml ve cerrahi grubu IV: 0,19 pg/ml olarak bulundu. Gruplar arası fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$). Kanda ölçülen DLL4 seviyelerine bakıldığında; cerrahi grubu I: 0,175 ng/ml ve cerrahi grubu II: 0,28 ng/ml olarak bulundu. Cerrahi grubu III ve IV ile kontrol grubundan alınan örneklerde düşük seviyeye bağlı olarak ölçüm yapılamadı. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.01$). DLL4 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, kontrol grubunda bazı endotel hücrelerde minimal sitoplazmik granüler boyanma gözlendi. Cerrahi uygulanan gruplarda kapiller proliferasyon alanlarında daha belirgin olmak üzere, endotel

hücrelerde değişken şiddetlerde yaygın pozitif reaksiyon gözlendi. Cerrahi grupları arası boyanma şiddetinde farklılık gözlenmedi.

Daha önce yapılan çalışmalarda, Çentik sinyal yolağının embriyo ve tümör damarlarında aktive olduğu gösterilmişti. Bu çalışmada, Çentik sinyal yolağının iskemi ile tetiklenen damarlanma esnasında aktive olduğunu göstermekteyiz.



VIII. Abstract

Postembryonic neoangiogenesis is a dynamic process which correlates with tissue's metabolic, immunologic and growth demands. The primary stimulus for postembryonic neoangiogenesis is thought to be ischemia. The Notch signaling pathway is implicated in cell-cell communication, which is important for the control of cell growth, differentiation, and specification. Functional Notch signaling is definitely required for normal vascular development, being part of the genetic program that determines the arterial and venous endothelium identity. In addition, growing evidence supports the involvement of the Notch ligand Delta like 4 in the regulation of sprouting angiogenesis in the embryonic period. This process is reportedly modulated by Dll4 signals from tip endothelial cells to neighboring stalk endothelial cells to restrict the emergence of excessive sprouting through repression of vascular endothelial growth factor receptor 2 transcription and consequent reduction of responsiveness to vascular endothelial growth factor. Blockade of Notch signaling reportedly slows down tumor growth despite an increase of tumor vasculature density because the established vascular network is functionally inefficient. However, the implication of Dll4 in reparative neovascularization after ischemia remains unexplored. We investigated the role of Dll4/Notch signaling in ischemic conditions.

The flap model was, 3X9 cm sized, caudally pedicled, random pattern skin flap on the back of rat (modified McFarlane flap). Thirty adult male Sprague-Dawley rats were used in this study. 2 groups were composed. Group I (control group): 6 rats were included in this group. Dorsal skin biopsies were performed and blood samples were collected without any surgical procedure. Group II (surgery group): 24 rats were included in this group. In all rats, dorsal skin flaps

were completely elevated and reinset. Flap biopsies were performed and blood samples were collected 24 hours, 3 days, 5 days and 10 days postsurgery. Tissue specimens were assessed for DLL4 and VEGF gene expression by reverse transcription- polymerase chain reaction analysis (RT-PCR). Plasma levels of VEGF and DLL4 were measured using ELISA. Immunohistochemical staining was used for detection of DLL4 in tissue materials.

Compared with nonischemic tissue, there was a 66% decrease in VEGF tissue expressions in ischemic tissues during the first postoperative day. Normal levels were reached at third postoperative day. Maximum levels were measured at the fifth postoperative day with an increase of 40%. There was a 68% decrease at the tenth postoperative day. The differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$). Compared with nonischemic tissue, there was a 63% decrease in DLL4 tissue expression levels in ischemic tissues during the first postoperative day. There was a 147% and 172% increase during the third and fifth days respectively. The differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$). The mean of plasma levels for VEGF were as follows; control group: 0,09 pg/ml, surgery group I: 0,37 pg/ml, surgery group II: 0,63 pg/ml, surgery group III: 0,25 pg/ml, surgery group IV: 0,19 pg/ml and control group: 0,09 pg/ml. The differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$). The mean of plasma levels for DLL4 were as follows; Surgery group I: 0,175 ng/ml, surgery group II: 0.28 ng/ml, surgery groups III, IV and control group: not detectable. The differences between groups were statistically significant ($P < 0.01$). Immunohistochemical analysis using specific anti-Dll4 antibodies revealed weak and patchy expression of Dll4 in microvascular ECs of normoperfused muscles. Conversely, Dll4 expression was upregulated in capillary endothelial cells after ischemia.

Previous studies reported DLL4 to be expressed in embryonic and tumor vasculature. In this study, we show the upregulation of the Notch ligand DLL4 in rat models of ischemia. As a result, we can suggest that the Notch pathway plays an important role during surgical delay in which ischemia-induced angiogenesis is stimulated. Therefore, therapeutic anti DLL4 could result in the increase of adequately functional blood vessels.



IX. Referanslar

1. Roy S, Khanna S, Sen CK. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free radical biology & medicine*. Jan 15 2008;44(2):180-192.
2. Jin SW, Patterson C. The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. May 2009;29(5):623-629.
3. Lucitti JL, Jones EA, Huang C, Chen J, Fraser SE, Dickinson ME. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development*. Sep 2007;134(18):3317-3326.
4. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KD, Fehling HJ, Keller G, Simon MC. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development*. Sep 2004;131(18):4623-4634.
5. Isogai S, Lawson ND, Torrealday S, Horiguchi M, Weinstein BM. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development*. Nov 2003;130(21):5281-5290.
6. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. Feb 15 2007;445(7129):776-780.
7. Myers MB, Cherry G. Mechanism of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg*. Jul 1969;44(1):52-57.
8. Myers MB, Cherry G. Differences in the delay phenomenon in the rabbit, rat, and pig. *Plast Reconstr Surg*. Jan 1971;47(1):73-78.
9. Myers MB, Cherry G. Augmentation of tissue survival by delay: an experimental study in rabbits. *Plast Reconstr Surg*. Apr 1967;39(4):397-401.
10. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. Jan 23 1987;235(4787):442-447.
11. Adair TH, Gay WJ, Montani JP. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *The American journal of physiology*. Sep 1990;259(3 Pt 2):R393-404.
12. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological reviews*. Apr 1992;72(2):369-417.
13. Egginton S. Effects of an anabolic hormone on aerobic capacity of rat striated muscle. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. Nov 1987;410(4-5):356-361.
14. Devעי D, Marshall JM, Egginton S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Jul 2001;281(1):H241-252.
15. Egginton S. Temperature and angiogenesis: the possible role of mechanical factors in capillary growth. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. Aug 2002;132(4):773-787.

16. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leukemia research*. Apr 2007;31(4):439-444.
17. Yi C, Xia W, Zheng Y, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells transferred by vascular endothelial growth factor gene for vascular regeneration of ischemic flaps. *The Journal of surgical research*. Sep 2006;135(1):100-106.
18. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. Jun 8 2004;109(22):2692-2697.
19. Griese DP, Ehsan A, Melo LG, et al. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*. Nov 25 2003;108(21):2710-2715.
20. Kubota Y, Kishi K, Satoh H, Tanaka T, Nakajima H, Nakajima T. Transplanted endothelial progenitor cells augment the survival areas of rat dorsal flaps. *Cell transplantation*. 2003;12(6):647-657.
21. Asai J, Takenaka H, Kusano KF, et al. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*. May 23 2006;113(20):2413-2424.
22. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. Aug 6 1999;85(3):221-228.
23. Torres-Vazquez J, Gitler AD, Fraser SD, et al. Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Developmental cell*. Jul 2004;7(1):117-123.
24. Tomanek RJ, Ishii Y, Holifield JS, Sjogren CL, Hansen HK, Mikawa T. VEGF family members regulate myocardial tubulogenesis and coronary artery formation in the embryo. *Circulation research*. Apr 14 2006;98(7):947-953.
25. Drake CJ, Fleming PA. Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo. *Blood*. Mar 1 2000;95(5):1671-1679.
26. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*. 1995;11:73-91.
27. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. Apr 17 1997;386(6626):671-674.
28. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. May 25 2006;441(7092):437-443.
29. Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. Feb 2005;4(1):3-8.
30. Moldovan L, Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. *Exs*. 2005(94):127-146.
31. Hudlicka O, Wright AJ, Ziada AM. Angiogenesis in the heart and skeletal muscle. *The Canadian journal of cardiology*. Mar-Apr 1986;2(2):120-123.
32. Ash JD, Overbeek PA. Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Developmental biology*. Jul 15 2000;223(2):383-398.
33. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, et al. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) is involved in guidance of VEGF receptor-positive cells to the anterior

- portion of early embryos. *Molecular and cellular biology*. Jan 2005;25(1):355-363.
34. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, et al. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Jul 2006;20(9):1495-1497.
 35. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*. Sep 2004;97(3):1119-1128.
 36. Stegmann TJ. FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Expert opinion on investigational drugs*. Dec 1998;7(12):2011-2015.
 37. Khurana R, Simons M. Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease. *Trends in cardiovascular medicine*. Apr 2003;13(3):116-122.
 38. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*. Nov 1993;119(3):957-968.
 39. Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, et al. Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Apr 2 1996;93(7):2867-2872.
 40. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M, Simon MC. HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Developmental cell*. Jul 2006;11(1):81-92.
 41. Yamakawa M, Liu LX, Date T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circulation research*. Oct 3 2003;93(7):664-673.
 42. Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circulation research*. Jul 20 2007;101(2):125-136.
 43. le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, et al. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development*. Jan 2004;131(2):361-375.
 44. Guthrie SM, Curtis LM, Mames RN, Simon GG, Grant MB, Scott EW. The nitric oxide pathway modulates hemangioblast activity of adult hematopoietic stem cells. *Blood*. Mar 1 2005;105(5):1916-1922.
 45. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jan 22 2002;99(2):715-720.
 46. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. May 1996;10(7):709-720.
 47. Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxidants & redox signaling*. Oct 2009;11(10):2517-2533.
 48. Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK. Dermal wound healing is subject to redox control. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Jan 2006;13(1):211-220.

49. Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Free radical research*. May 2004;38(5):501-508.
50. Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free radical biology & medicine*. Sep 1994;17(3):259-266.
51. Sauer H, Bekhite MM, Hescheler J, Wartenberg M. Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electrical field stimulation. *Experimental cell research*. Apr 1 2005;304(2):380-390.
52. Huang SS, Zheng RL. Biphasic regulation of angiogenesis by reactive oxygen species. *Die Pharmazie*. Mar 2006;61(3):223-229.
53. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1998;38:97-120.
54. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Dec 1999;79(12):1469-1477.
55. Jones MK, Wang H, Peskar BM, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature medicine*. Dec 1999;5(12):1418-1423.
56. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*. Jun 2003;9(6):685-693.
57. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. Apr 4 1996;380(6573):439-442.
58. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. Jun 15 1989;161(2):851-858.
59. Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *The Journal of biological chemistry*. Sep 6 1996;271(36):21793-21797.
60. Bonomo SR, Davidson JD, Yu Y, Xia Y, Lin X, Mustoe TA. Hyperbaric oxygen as a signal transducer: upregulation of platelet derived growth factor-beta receptor in the presence of HBO₂ and PDGF. *Undersea & hyperbaric medicine : journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc*. Winter 1998;25(4):211-216.
61. Chodobski A, Chung I, Kozniwska E, et al. Early neutrophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury. *Neuroscience*. 2003;122(4):853-867.
62. Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis*. 2003;6(4):283-287.
63. Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Journal of surgical oncology*. Aug 1 2004;87(2):95-104.
64. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature reviews. Cancer*. Aug 2002;2(8):573-583.

65. Shen H, Clauss M, Ryan J, et al. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*. May 15 1993;81(10):2767-2773.
66. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. Sep 1991;6(9):1677-1683.
67. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *The Journal of biological chemistry*. Oct 14 1994;269(41):25646-25654.
68. Xue Y, Petrovic N, Cao R, et al. Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell metabolism*. Jan 7 2009;9(1):99-109.
69. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. Aug 2004;25(4):581-611.
70. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Aug 4 1998;95(16):9349-9354.
71. LeCouter J, Moritz DR, Li B, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. Feb 7 2003;299(5608):890-893.
72. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. Jul 6 1995;376(6535):62-66.
73. Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, et al. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Mar 2004;286(3):H946-954.
74. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. May 1997;124(10):2039-2048.
75. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, et al. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. Jun 27 2002;417(6892):954-958.
76. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *British journal of cancer*. May 22 2006;94(10):1355-1360.
77. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nature cell biology*. Jan 2002;4(1):E2-5.
78. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*. May 1995;146(5):1029-1039.
79. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. Feb 1997;18(1):4-25.
80. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *The American journal of pathology*. Jul 1996;149(1):293-305.

81. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *British journal of plastic surgery*. Apr 2000;53(3):234-239.
82. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Experimental cell research*. Feb 1994;210(2):298-305.
83. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. Dec 8 1989;246(4935):1306-1309.
84. Nagy JA, Vasile E, Feng D, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. Dec 2 2002;196(11):1497-1506.
85. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation*. Jan 1999;103(2):159-165.
86. Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 10 1996;93(25):14765-14770.
87. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*. Mar 1999;126(6):1149-1159.
88. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *The Journal of experimental medicine*. Dec 1 1990;172(6):1535-1545.
89. Hattori K, Dias S, Heissig B, et al. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*. May 7 2001;193(9):1005-1014.
90. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circulation research*. Jun 23 2000;86(12):1198-1202.
91. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, et al. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *The Annals of thoracic surgery*. Sep 2000;70(3):829-834.
92. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. Jun 1 1997;99(11):2625-2634.
93. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 27 2001;98(5):2604-2609.
94. Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation

and wound healing. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. Dec 1987;57(6):673-686.

95. Detmar M, Brown LF, Berse B, et al. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *The Journal of investigative dermatology*. Mar 1997;108(3):263-268.
96. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*. Nov 1994;90(5 Pt 2):II228-234.
97. Semenza GL. Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annual review of medicine*. 2003;54:17-28.
98. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology*. Sep 2002;64(5-6):993-998.
99. Gordillo GM, Sen CK. Revisiting the essential role of oxygen in wound healing. *American journal of surgery*. Sep 2003;186(3):259-263.
100. Allen DB, Maguire JJ, Mahdavian M, et al. Wound hypoxia and acidosis limit neutrophil bacterial killing mechanisms. *Arch Surg*. Sep 1997;132(9):991-996.
101. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *The Journal of biological chemistry*. Nov 15 1996;271(46):29483-29488.
102. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS letters*. Sep 18 1995;372(1):83-87.
103. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, et al. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*. Dec 1996;120(6):944-947.
104. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Apr 1998;83(4):1342-1347.
105. Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *The Journal of biological chemistry*. Sep 6 2002;277(36):33284-33290.
106. Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, Castellanos MC, et al. Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. Sep 2006;291(3):H1395-1401.
107. Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M. Stretch-induced VEGF expression in the heart. *The Journal of clinical investigation*. Jul 1 1997;100(1):18-24.
108. Mohr OL. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics*. May 1919;4(3):275-282.
109. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. Apr 30 1999;284(5415):770-776.

110. Delwig A, Rand MD. Kuz and TACE can activate Notch independent of ligand. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. Jul 2008;65(14):2232-2243.
111. De Strooper B, Annaert W, Cupers P, et al. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. Apr 8 1999;398(6727):518-522.
112. Spinner NB. Alagille syndrome and the notch signaling pathway: new insights into human development. *Gastroenterology*. May 1999;116(5):1257-1260.
113. del Rio-Espinola A, Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, et al. Novel human pathological mutations. Gene symbol: NOTCH3. Disease: CADASIL. *Human genetics*. Apr 2010;127(4):474.
114. Hainaud P, Contreres JO, Villemain A, et al. The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer research*. Sep 1 2006;66(17):8501-8510.
115. Duarte A, Hirashima M, Benedito R, et al. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & development*. Oct 15 2004;18(20):2474-2478.
116. Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 9 2004;101(45):15949-15954.
117. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & development*. Jun 1 2000;14(11):1343-1352.
118. Huppert SS, Le A, Schroeter EH, et al. Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature*. Jun 22 2000;405(6789):966-970.
119. Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*. Apr 12 2005;111(14):1826-1832.
120. Conlon RA, Reaume AG, Rossant J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development*. May 1995;121(5):1533-1545.
121. Swiatek PJ, Lindsell CE, del Amo FF, Weinmaster G, Gridley T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & development*. Mar 15 1994;8(6):707-719.
122. Hofmann JJ, Luisa Iruela-Arispe M. Notch expression patterns in the retina: An eye on receptor-ligand distribution during angiogenesis. *Gene expression patterns : GEP*. Feb 2007;7(4):461-470.
123. Claxton S, Fruttiger M. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene expression patterns : GEP*. Nov 2004;5(1):123-127.
124. Gerhardt H, Betsholtz C. How do endothelial cells orientate? *Exs*. 2005(94):3-15.
125. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*. Jun 23 2003;161(6):1163-1177.
126. Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental cell*. Jul 2002;3(1):127-136.

127. Seo S, Kume T. Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Developmental biology*. Aug 15 2006;296(2):421-436.
128. Lawson ND, Scheer N, Pham VN, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*. Oct 2001;128(19):3675-3683.
129. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development*. Oct 15 2004;18(20):2469-2473.
130. You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*. May 5 2005;435(7038):98-104.
131. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, et al. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Molecular and cellular biology*. Jan 2003;23(1):14-25.
132. Nosedá M, Chang L, McLean G, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Molecular and cellular biology*. Oct 2004;24(20):8813-8822.
133. Deng DX, Tsalenko A, Vailaya A, et al. Differences in vascular bed disease susceptibility reflect differences in gene expression response to atherogenic stimuli. *Circulation research*. Feb 3 2006;98(2):200-208.
134. Karsan A. The role of notch in modeling and maintaining the vasculature. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. Jan 2005;83(1):14-23.
135. Alva JA, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in vascular morphogenesis. *Current opinion in hematology*. Jul 2004;11(4):278-283.
136. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Apr 1 2003;23(4):543-553.
137. Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & development*. Nov 15 2004;18(22):2730-2735.
138. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec 2001;25(4):402-408.
139. Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. Feb 15 2007;445(7129):781-784.
140. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer*. Jun 2003;3(6):401-410.
141. Patel NS, Li JL, Generali D, Poulosom R, Cranston DW, Harris AL. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer research*. Oct 1 2005;65(19):8690-8697.
142. Curry CL, Reed LL, Golde TE, Miele L, Nickoloff BJ, Foreman KE. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene*. Sep 22 2005;24(42):6333-6344.
143. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Annals of surgery*. Jun 2004;239(6):866-873; discussion 873-865.

144. Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS letters*. Aug 21 1995;370(3):203-208.
145. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*. Dec 21 2006;444(7122):1032-1037.
146. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*. Dec 21 2006;444(7122):1083-1087.
147. Scehnet JS, Jiang W, Kumar SR, et al. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*. Jun 1 2007;109(11):4753-4760.
148. Trindade A, Djokovic D, Gigante J, et al. Low-dosage inhibition of Dll4 signaling promotes wound healing by inducing functional neo-angiogenesis. *PLoS one*. 2012;7(1):e29863.
149. Milton SH. The effects of "delay" on the survival of experimental pedicled skin flaps. *British journal of plastic surgery*. Jul 1969;22(3):244-252.
150. Pearl RM. A unifying theory of the delay phenomenon--recovery from the hyperadrenergic state. *Annals of plastic surgery*. Aug 1981;7(2):102-112.
151. Cutting CB, Bardach J, Finseth F. Haemodynamics of the delayed skin flap: a total blood-flow study. *British journal of plastic surgery*. Apr 1981;34(2):133-135.
152. Finseth F, Cutting C. An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1978;61(3):412-420.
153. Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of the pharmacologic control of blood flow to acute skin flaps using xenon washout. Part I. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1983;71(3):387-398.
154. Hendel PM, Lilien DL, Buncke HJ. A study of the pharmacologic control of blood flow to delayed skin flaps using xenon washout. Part II. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1983;71(3):399-407.
155. Sasaki GH, Pang CY. Pathophysiology of skin flaps raised on expanded pig skin. *Plastic and reconstructive surgery*. Jul 1984;74(1):59-67.
156. Haughey BH, Panje WR. Extension of the musculocutaneous flap by surgical delay. *Arch Otolaryngol*. Apr 1985;111(4):234-240.
157. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, Lindsay WK. Augmentation of blood flow in delayed random skin flaps in the pig: effect of length of delay period and angiogenesis. *Plastic and reconstructive surgery*. Jul 1986;78(1):68-74.
158. Morris SF, Taylor GI. The time sequence of the delay phenomenon: when is a surgical delay effective? An experimental study. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1995;95(3):526-533.
159. Dhar SC, Taylor GI. The delay phenomenon: the story unfolds. *Plastic and reconstructive surgery*. Dec 1999;104(7):2079-2091.
160. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plastic and reconstructive surgery*. Sep 1999;104(3):730-737.

161. Mathes SJ, Vasconez LO. Myocutaneous free-flap transfer. Anatomical and experimental considerations. *Plastic and reconstructive surgery*. Aug 1978;62(2):162-166.
162. Jonsson K, Hunt TK, Brennan SS, Mathes SJ. Tissue oxygen measurements in delayed skin flaps: a reconsideration of the mechanisms of the delay phenomenon. *Plastic and reconstructive surgery*. Aug 1988;82(2):328-336.
163. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, Minabe T. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1992;89(3):397-407; discussion 417-398.
164. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 1992;89(3):408-416; discussion 417-408.
165. Murphy RC, Lawrence WT, Robson MC, Heggors JP. Surgical delay and arachidonic acid metabolites: evidence for an inflammatory mechanism: an experimental study in rats. *British journal of plastic surgery*. Apr 1985;38(2):272-277.
166. Wong MS, Erdmann D, Sweis R, et al. Basic fibroblast growth factor expression following surgical delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. *Plastic and reconstructive surgery*. Jun 2004;113(7):2030-2036.
167. Carroll SM, Carroll CM, Stremel RW, et al. Vascular delay and administration of basic fibroblast growth factor augment latissimus dorsi muscle flap perfusion and function. *Plastic and reconstructive surgery*. Mar 2000;105(3):964-971.
168. Carroll CM, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH. Augmentation of skeletal muscle flap survival using platelet derived growth factor. *Plastic and reconstructive surgery*. Aug 1998;102(2):407-415.
169. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood*. Feb 1 2005;105(3):1068-1077.
170. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 28 2000;97(7):3422-3427.
171. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. Feb 12 2002;105(6):732-738.
172. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. Feb 6 2001;103(5):634-637.