

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Tavuk Embriyosu Koryoallantoik Membranında Görülen Anjiyogenez Sürecinde C-Tipi Natriüretik Peptid-3 ve Natriüretik Peptid Reseptör-B mRNA İfadelerinin Analizi: Tanımlayıcı Bir Çalışma

Ekin EFE¹, Attila DAĞDEVİREN¹, Fevziye Figen KAYMAZ², Ahmet Çevik TUFAN³

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Tavuk koryoallantoik membran (CAM) modeli, anjiyogenez çalışmalarında gelişimsel süreçleri takip etmek için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Bu çalışmada, CAM kullanılarak, embriyonik gelişimin 7. ve 20. günleri (E7 ve E20) arasında görülen anjiyogenez süreci ışık ve transmisyon elektron mikroskop analizleri ile takip edilmiştir. Ayrıca, aynı günlerde alınan CAM örnekleri kullanılarak, anjiyogenez mekanizmalarında görevli [Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)-A ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)-2] ve reseptörlerinin [Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR)-2 ve Fibroblast Büyüme Faktörü (FGFR)-2] yanı sıra, insan C-tipi natriüretik peptid (CNP) homoloğu olan tavuk CNP-3 ve reseptörü natriüretik peptid reseptörü (NPR)-B'nin mRNA ifade düzeylerinin zamana bağlı değişimi analiz edilmiştir. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu analizleri, endotel tüp benzeri vasküler yapıları yoğun olarak E7-E8 günlerinde ve koryonik mezenseim içinde bulunduğunu göstermiştir. E9-E20 günler sürecinde ise mezenseim içinde yer alan vasküler yapıların progresif gelişimi, stabilizasyonu ve kompleks dallanması gözlenmiştir. Bu vasküler gelişim sürecinde, VEGF-A ve FGF-2 mRNA ifadesi, CAM gelişiminin erken aşamalarında E7 ile E9 arasında ve E8'de pik yapacak şekilde gözlenmiştir. Bu moleküller, CAM gelişiminin geç döneminde, E16 civarında ikinci bir pik göstermiştir. CNP-3 mRNA ifadesi E16 ile E20 arasında VEGF-A ve FGF-2 mRNA ifadeleri ile eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. VEGFR-2 mRNA ifadesi E7-E12 arasında gözlenirken, FGFR-2 mRNA ifadesi ilk pikini E7-E9 arasında ve ikinci pikini E16-20 arasında göstermiştir. NPR-B mRNA ifadesi ise en yüksek seviyesi E16'da olmak üzere E7-E20 arasında gözlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen veriler, CNP-3'ün özellikle CAM gelişiminin geç döneminde (E16-E20 günleri sürecinde), NPR-B reseptörü aracılığıyla, ileri vasküler organizasyonda rol oynayabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: CNP. CNP-3. NPR-B. Anjiyogenez. Koryoallantoik membran (CAM).

Analysis of the mRNA Expression of C-Type Natriuretic Peptide-3 and Natriuretic Peptide Receptor-2 in Angiogenesis of Chick Chorioallantoic Membrane: A Descriptive Study

ABSTRACT

The chick chorioallantoic membrane (CAM) is a widely used model to follow the developmental processes in angiogenesis studies. This study aims to describe the putative involvement of CNP-3, the chick homolog of human CNP, and its receptor natriuretic peptide receptor (NPR)-B besides known angiogenic factors and their receptors, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A/vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 and fibroblast growth factor (FGF)-2/fibroblast growth factor receptor (FGFR)-2, in angiogenesis of the CAM. CAM samples between developmental days E7 and E20 were collected for light microscopic and transmission electron microscopic analyses. Expression of CNP-3/NPR-B, VEGF-A/VEGR-2, FGF-2/FGFR-2 mRNA in these CAM samples were also studied between E7 and E20. Light microscopy and electron microscopy analyzes showed that, vascular organization was mostly within the chorionic mesenchyme as endothelial tube-like structures on E7-E8 days. On E9 and later, advanced blood vessels were observed within the mesenchyme. VEGF-A and FGF-2 expression were observed in the early stages of CAM development (E7-E9) with a peak at E8. These molecules showed a second peak at around E16. Co-expression of VEGF-A, FGF-2 and CNP-3 were seen at E16-E20. VEGFR-2 expression was observed between E7-E12, whereas expression of FGFR-2 showed its first peak between E7-E9 and its second peak between E16-20. NPR-B expression, on the other hand, was observed between E7-E20 with its highest level at E16. In conclusion, the results revealed that CNP-3 may have a role in vascular organization via its NPR-B receptor in the later stages, i.e., E16-E20, of CAM development.

Key Words: CNP. CNP-3. NPR-B. Angiogenesis. Chorioallantoic membrane (CAM).

Geliş Tarihi: 05.Nisan.2021

Kabul Tarihi: 04.Mayıs.2021

Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
Ankara, Türkiye.
Tel.: 0530 328 49 69
E-posta: ctufan76@gmail.com

Yazarların ORCID ID Bilgisi:

Ekin EFE: 0000-0001-6955-9839

Attila DAĞDEVİREN: 0000-0001-8990-8282

F. Figen KAYMAZ: 0000-0001-8896-2471

Ahmet Çevik TUFAN: 0000-0002-5920-0475

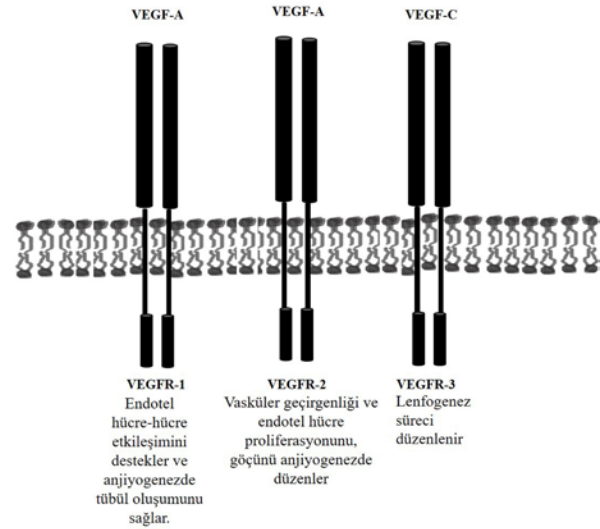
Vaskülogenez ve anjiyogenez embriyoda vasküler ağın oluşumunu ve gelişimini sağlayan iki temel süreçtir¹⁻⁵. Vaskülogenez, mezoderm kökenli anjiyoblastların farklılaşması sonucunda endotel ve primordiyal kan hücrelerine dönüşmesi, dolayısıyla *de novo* olarak ortaya çıkan primitif kan damarlarının oluşumu şeklinde tanımlanır²⁻⁶. Öte yandan, anjiyogenez vaskülogenezden farklı olarak, önceden var olan kan damarlarından endotelial proliferasyon ve migrasyon mekanizmaları ile yeni kan damarlarının oluşma sürecidir. Filizlenme ve intussusseptif olarak iki farklı anjiyogenez mekanizması tanımlanmıştır. Filizlenme şeklinde görülen anjiyogenez sürecinde endotelial proliferasyon ve hücre göçü sonucunda endotelial tüp oluşumu ortaya çıkar^{2,6-10}. Intussusseptif anjiyogenez ise, önceden var olan damarların mikrovasküler büyümesinden kaynaklanır ayrıca vasküler ağın yeniden şekillenmesi ve genişlemesinden de sorumludur⁹.

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF, FGF-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hem vaskülogenezde hem de anjiyogenezde anahtar rol oynayan önemli faktörler olarak bilinmektedir¹¹. Kan damarlarının ilk oluşum sürecinde, mezodermi uyaran bir faktör olarak bFGF, embriyoda anjiyoblastlar ve hematopoetik hücreler oluşturmak için paraksiyal ve lateral mezodermi uyarır. VEGF ise bu hücrelerin daha fazla farklılaşmasına neden olur. Anjiyoblastlar, VEGF ve reseptörü olan vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-2 (VEGFR2 / flk-1 / KDR) aracılığıyla endotel hücrelerine farklılaşır.

VEGF ailesi; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D'yi içerir. Bunlar arasında VEGF-A, vaskülogenez ve anjiyogenezde önemli role sahiptir. Bu aile biyolojik işlevlerini tip III reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanarak gösterir. Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGR-1 / Flt-1), VEGFR-2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-3 (VEGFR-3 / Flt-4) bu kinaz ailesinin üyeleridir. Reseptörler, immünoglobulin benzeri (Ig benzeri) domain, transmembran domain ve hücre içi tirozin kalıntıları taşıyan kinaz domaini gibi sinyal kalıntılarını içerir. Bu reseptörler yaygın olarak normal fizyolojik koşullar altında, endotel hücrelerinin, hematopoetik hücrelerin, makrofajların ve vasküler düz kas hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir¹².

Kan damarı oluşumu için temel olarak VEGF-A gerekli iken; lenfatik damarların oluşumu için VEGF-C gereklidir. VEGF-A, VEGFR-1 veya VEGFR-2'ye bağlanarak anjiyogenez ve vaskülogenezde aktivite gösterirken; VEGF-C, VEGFR-3'e bağlanarak lenfogenезin düzenlenmesinde görev alır¹² (Şekil 1). VEGF-A, anjiyogenezde endotel hücre filizlenmesinde VEGFR-2'ye bağlanarak endotel hücrelerinin geçirgenliğinin ve göçünün artmasında rol oynar. VEGF-A'nın VEGFR-1'e bağlanması, endotel hücre bölünmesini düzenleyerek gelişimsel kan damarı oluşumunu düzenler ve tüp oluşumu için endotel hücre

etkileşimini destekler. VEGFR-2 "knock-out" farelerde hiçbir vasküler oluşum gözlenmemektedir. Dolayısıyla, VEGF-A ve VEGFR-2 etkileşimi, vaskülogenez yoluyla ilkel damarların oluşumu için gereklidir. Ayrıca, gelişimin sonraki dönemlerinde ilkel vasküler ağ yapısının anjiyogenez ile daha kompleks hale gelmesi için de VEGF-A/VEGR-2 etkileşimi gereklidir. VEGFR-1 "knock-out" farelerde, anormal derecede geniş bir vasküler oluşum gözlenmektedir. VEGFR-1'in kinaz domaininin, normal vasküler gelişimde önemli olduğu bu şekilde gösterilmiştir^{13,14}.



Şekil 1.

VEGF-A ile reseptörleri olan VEGFR-1 ve VEGFR-2 etkileşimi, sırasıyla yeni damarların oluşumunu ve stabilitesini düzenler. VEGF-C, lenfogenезi uyarmak için VEGFR-3 aracılığıyla etkisini gösterir.

Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi ilk keşfedildiğinde, fibroblastlar üzerinde mitojenik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. İlerleyen yıllarda, FGF'in embriyodaki mezoderm kaynaklı vasküler endotelial hücrelerin farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, FGF endotel hücre mitojeni olarak da bilinmektedir. Bununla bağlantılı olarak, embriyoda kan damarı oluşumu ve/veya vasküler bütünlüğün korunması için FGF-2 gereklidir. Aynı zamanda hücre büyümesi ve çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması için güçlü bir düzenleyicidir¹⁵⁻¹⁷. FGF ailesinin üyeleri, farklı FGF reseptörlerinin varyantları aracılığıyla sinyal iletmeye özelliğine sahiptir¹⁷. Bunlardan en çok çalışılanları, FGF-1 ve FGF-2'dir. FGF-1 ifadenmesi esas olarak merkezi sinir sisteminde görülürken; FGF-2, endotel hücreleri dahil birçok hücre tipinde ifade edilir. FGF-2, endotel hücre göçü üzerinde de etkilidir. Ayrıca, FGF-2 doku iyileşmesi, anjiyogenez, miyogenez, hematopoez gibi çeşitli süreçlerde de rol oynar¹⁸. FGF-2 etkisini, reseptör tirozin kinazlarla etkileşim yoluyla gösterir. Bu reseptör kinazlar, hücre yüzey reseptörleri olan fibroblast büyüme faktörü reseptörü-

Anjiyogenez Sürecinde CNP-3 ve NPR-B Ekspresyonu

1 ila -4 (FGFR1-4) ve hücre yüzeyine bağlanan heparan sülfat proteoglikanlardır (HSPG'ler). FGFR'ler, FGF-2'nin hücreler üzerindeki etkilerine aracılık ederken; HSPG'ler, FGF-2'nin reseptörlerine bağlanmasını modüle eder. FGFR1 daha fazla olacak şekilde hem FGFR-1 hem de FGFR-2'nin her ikisi de endotel hücrelerinde ifade edilir¹⁹. FGF-2'nin anjiyogenezdeki etkisi, tavuk koryoallantoik membran (CAM) modeli ve/veya tavuşanın korneası modeli kullanılarak gösterilmiştir^{20,21}.

Natriüretik peptid ailesi, yapısal olarak ilişkili en az üç peptid içerir. Bunlar atriyal natriüretik peptid (ANP), beyin natriüretik peptid (BNP) ve C-tipi natriüretik peptid (CNP). ANP ve BNP, esas olarak sırasıyla atriyum ve ventrikül tarafından üretilen kardiyak hormonlar olarak bilinir. Öte yandan CNP, merkezi sinir sisteminde baskındır; ancak aynı zamanda kıkırdak, epifiz plağı, kondrositler, osteoblastlar, osteoklastlar, endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücreleri dahil olmak üzere çok çeşitli doku ve hücrelerde ifade edilir²²⁻²⁵.

Natriüretik peptitler için bilinen üç tip reseptör vardır. Bunlar: natriüretik peptid reseptörü-A (NPR-A, GC-A, NPR1), natriüretik peptid reseptörü-B (NPR-B, GC-B, NPR2) ve natriüretik peptid reseptörü-C (NPR-C, NPR3) olarak adlandırılırlar. Natriüretik peptitler, bu reseptörlere seçici olarak bağlanır. NPR-A için ligand seçiciliğinin sırası ANP> BNP>> CNP, NPR-B için CNP>> ANP> BNP ve NPR-C için ANP> CNP> BNP şeklindedir^{22,23,26}. NPR-A ve NPR-B, insanlarda bulunan 5 transmembran guanil siklazdan ikisidir. Üçüncü natriüretik peptid reseptörü olan NPR-C, aktivitesini çoğunlukla üç peptid molekülünün lokal konsantrasyonunu ayarlayarak gösterir²⁶. Bu özelliğinden dolayı NPR-C, natriüretik peptidlerin klirens (temizleme) reseptörü olarak bilinir²⁷.

CNP'nin, endotel hücreleri, kardiyomyositler ve vasküler düz kas hücreleri üzerinde, kardiyovasküler sistemde otokrin ve parakrin etkileri olduğu gösterilmiştir^{24,25,28-30}. Son çalışmalar, CNP'nin kardiyovasküler sistemde inflamasyon, anjiyogenez, düz kas ve endotel hücre proliferasyonu, ateroskleroz, hipertansiyon ve iskemide düzenleyici bir rol oynadığını ortaya koymuştur^{25,31}. CNP, bu süreçlerde reseptörleri olan NPR-B ve NPR-C aracılığıyla etki gösterir^{25,31}. NPR-B, vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilir. Bu noktada, CNP ve NPR-B etkileşimi, anjiyogenezin ilerlemesinden ziyade vasküler tonusun lokal ayarlanmasıyla ilişkilidir²⁵. CNP'nin endotel hücreler üzerindeki göç etkisinin, anjiyogenezde potasyum kanallarının ATP aracılı aktivasyonu ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir. Bu çalışmada³², ölümsüzleştirilmiş fare beyin mikrovasküler endotel hücre hattı (BEnd.3) ve insan göbek kordonu damar endotel hücreleri (HUVECs) kullanılarak potasyum kanalları aracılığıyla CNP ve VEGF'in etkileri analiz edilmiştir. Sonuçlar, potasyum kanal aktivatörleri, CNP ve VEGF kullanımının anji-

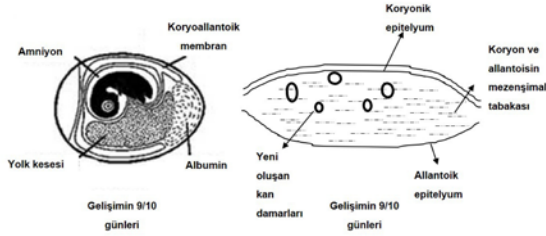
yogenezde benzer sonuçlar verdiğini göstermiştir. Ek olarak, aynı sonuçlar CAM analizi ile gösterilmiş ve potasyum kanal inhibitörleri kullanıldığında, CNP aracılı anjiyogenezin CAM yapısında bozulduğu gösterilmiştir. CNP'nin bu etkisine NPR-C'nin aracılık ettiği düşünülmüştür³². Başka bir çalışma³¹, CNP'nin konsantrasyona bağlı bir şekilde verildiğinde (1 µM konsantrasyonda), aort filizlenme testinde VEGF'e benzer bir yanıt ürettiğini ve bu etkinin NPR-C'ye bağlı olduğunu; ancak NPR-B'den bağımsız olduğunu göstermiştir. Ek olarak, endotelial CNP'nin, anjiyogenez ve vasküler yeniden modellenme sürecinde iskemiyeye yanıt olarak NPR-C aracılı bir etki gösterdiği ve reseptörün bu etkiyi Gi uyarımı, ERK1 / ERK2 ve PI3Kγ / Akt / protein kinaz-B aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir³¹. Bu çalışmalarda, CNP/NPR-C sinyal yolunun anjiyogenezdeki rolünün altı çizilmiştir.

Anjiyogenezin düzenlenmesinde CNP ile VEGF ve bFGF arasında ilişki olduğunu öne süren çalışmalar vardır. VEGF'in endotel hücrelerinde CNP salınımını inhibe ettiği ve CNP'nin VEGF üzerinde aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir³¹. Başka bir çalışma, bFGF ve CNP arasındaki ilişkiyi göstermiştir. bFGF uyarımının aort ve beyin vasküler düz kas hücrelerinde CNP mRNA ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, aort düz kas hücrelerinde bFGF'in etkisi altında TGF-β aracılı uyarmanın CNP üretimini ve salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir³³.

C-tipi natriüretik peptid, 2q24-qtter bir kromozomal lokasyona sahip tek bir gen, natriüretik peptid öncüsü C'nin (Nppc) ürünüdür^{23,26}. Houweling ve ark.³⁴, tavuk natriüretik peptid öncü gen kümesini tanımlayarak karakterize etmiş ve bu genin organizasyonunun, memeli Nppb-Nppa kümesiyle karşılaştırıldığında yüksek oranda korunmuş olduğunu bulmuştur³⁵. Buna ek olarak, tavuk CNP-3, insan CNP'sinin amino asit dizisiyle yüksek homoloji göstermektedir³⁴. Dolayısıyla tavuk CAM modelinin kullandığı bu çalışmada, önceki çalışmalarımızda da^{23,35} kullanılmış olan CNP-3/NPR-B dizilerini, revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz yöntemi seçilmiştir.

Tavuk embriyosu gelişiminin başlangıcında koryoallantoik membran (CAM) avaskülarize bir yapıdır. Yumurtanın inkübasyonunun 5. gününde [(embriyonik 5. gelişim günü (E5)], CAM vaskülarizasyonu başlar. Tavuk embriyosunun allantoisi, inkübasyonun 3. günü civarında ventral endoderm arka bağırsak duvarı boyunca ilerler. Embrioyu ekstraembriyonik söloma doğru iter. E4 ve E10 arasındaki dönemde, allantoisin mezoderm tabakası (splanknik mezoderm), koryonun mezoderm tabakası (somatik mezoderm) ile birleşir ve böylece koryoallantoik membran oluşur (Şekil 2). Başka bir deyişle, CAM yapısı allantoisin epitel tabakası ile koryonun epitel tabakası arasında kalan splanknik ve somatik mezoderm tabakaların birleşmesinden oluşur. CAM yapısına katılan çift katmanlı

mezoderm kan damarları açısından zengindir ve embriyonik dolaşıma iki allantoik arter ve bir allantoik ven aracılığıyla bağlanır. Allantoik arterler ve ven embriyonik dolaşıma katkı sağlar. Bu yapılar, memelilerde bulunan umbilikal arterler ve vene benzer^{36,37}.



Şekil 2.

CAM, allantois ve koryon epiteli ile bunların mezenşim tabakalarından oluşur. CAM, embriyonik 4. günden itibaren gelişmeye başlar ve 10. günde gelişimini büyük ölçüde tamamlayarak yumurta kabuğunun içini tamamen kaplar. Yapısında yoğun bir vasküler ağ barındırır.

Tavuk CAM modeli, anjiyogenez çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır³⁸⁻⁴⁰. Endotel hücrelerin filizlenmesi ile izlenen anjiyogenez, E5 ila E7 gelişimi arasında görülür. Bu, CAM vasküler büyümesinin ilk aşaması olarak düşünülmektedir. E8-E12 arasında, intususseptif anjiyogenez (intususseptif mikrovasküler büyüme) belirgindir ve E13-E14 sırasında vasküler ağ, herhangi yeni bir ağ oluşumu veya karmaşık yapı olmaksızın hacim ve kütle olarak büyür^{40,41}. CAM'ın genel vasküler yapısı, kabuğa en yakın koryonik epitle bitişik bulunan kılcal vasküler tabakadan ve CAM içinde serbestçe yüzen ve embriyonik hareketler ile uyumlu hareket edebilen, daha derin ve daha büyük damarlardan oluşur^{40,42}. İlk aşamada henüz olgunlaşmamış kan damarları ve düz kas hücreleri mezoderm içinde yer alır. Kan damarları E8'e kadar çok hızlı büyür ve üzerini örten koryonik epitel hücreleri ile ilişkili kılcal pleksusa köken vererek dış çevre ile gaz alış-verişine aracılık eder^{40,43,44}. CAM, yüzey alanında hızlı büyümeye devam eder ve E10-E11 civarında CAM, yumurta kabuğu açıldığında altında açıkça görülebilir^{40,45,46}. E12'de CAM, iç kabuk zarının tüm yüzeyini kaplar ve E14'e kadar yüzey alanı genişlemeye devam eder^{40,47}. E16'da CAM'ın kılcal vasküler ağı ince yapısı, koryonik epitele komşu mezoderm içinde ve devamlı bir endotel tabakası ile örtülü, çevresindeki perisitlerin koryonik epitel içerisinde görüldüğü yoğun bir pleksus olarak tanımlanır^{40,48}. CAM'ın vasküler sistemi E18'de son kompleks yapısına ulaşır^{40,49}.

Kan damarlarının oluşumu, vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerini içeren kompleks bir olaydır. Büyüme faktörleri ve etki gösterdikleri sinyal yolları, bu süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışma, gelişimi sürecinde CAM yapısını ışık ve elektron mikroskop

incelemelerinde tanımlamak ve CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenez sürecinde bilinen anjiyogenik faktörler olan VEGF-A ve FGF-2'nin yanı sıra CNP-3'ün mRNA ifade profilini, dolayısıyla süreçteki olası katkısını zamansal açıdan analiz etmek için planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Tavuk Embriyolarının Elde Edilmesi

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: DA20/14). "ATAK-S" soyundan fertilize tavuk yumurtaları T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Yumurtalar, 37.5 °C'de ve nemli ortamını koruyan yumurta inkübatöründe istenilen süre inkübe edilmiştir. Çalışmada %10 oranında döllenmemiş yumurta olabileceği göz önüne alınmıştır ve buna bağlı olarak 90 adet tavuk yumurtası ile çalışılmıştır.

CAM Doku Örneklerinin Toplanması, Işık Mikroskobu ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile CAM Örneklerinin Yapısal Analizi

Steril cerrahi aletlerle yumurtanın kabuğunun sivri olmayan tarafında bir pencere açılarak E7'den E20'ye kadar CAM doku örnekleri kesip çıkarılan kabuk altından toplanmıştır. Örnekler, ışık mikroskobu için %4 paraformaldehit içerisinde ve TEM için %2 glutaraldehit solusyonunda tespit edilmiştir⁵⁰. Işık mikroskop analizi için rutin histolojik teknikler kullanılmıştır. Gece boyu %4 paraformaldehit tespitinden sonra, örnekler %70 alkol içerisine alınmış ve artan dereceli alkol serisinden (%75, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edilmiştir. Ksilol ile muamele sonrasında parafinde 3 saat bekletilen dokular parafin bloklara gömülmüştür. Lizin kaplı lamalar üzerine 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınmış ve ardından hematoksilen-eozin ile boyanmıştır. Işık mikroskopik analiz için ek olarak, %2 glutaraldehit ile tespit edilmiş CAM örneklerinden yarı ince kesitler hazırlanmıştır. Bunun için dokular glutaraldehit tespiti sonrasında küçük parçalara bölünmüş ve ikinci defa osmiyum tetroksitle tespit edildikten sonra, fazla suyun uzaklaştırılması için artan derecelerdeki etil alkol serilerinden geçirilmiştir. Örnekler propilen oksit, gömme materyalinde (v/v) [10 ml Araldit Resin, 10 ml Dodesenil süksinik anhidrit (DDSA), 0.5 ml Benzildimetilamin (BDMA), 1 ml Dibütül fitalat] 30 dakika bekletilmiştir. Sonrasında, %25 propilen oksit + %75 kısım gömme materyalinde (v/v), karıştırıcı üzerinde, oda ısısında, 2 saat karıştırılmıştır. Son olarak dokular gömme materyali ile gömme kapsülüne gömülmüştür. Hazırlanan bloklardan ultramikrotom ile 1 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak %1 toluidin mavisi ile boyanıp ışık

Anjiyogenez Sürecinde CNP-3 ve NPR-B Ekspresyonu

mikroskobu ile incelenmiştir. Müsküler arterlerinin gelişimi, arteriyollerin ilk görüldüğü zaman noktası, CAM yapısındaki bağ dokusu kalınlığı ve damar duvar kalınlığındaki değişim gibi tanımlayıcı parametreler ışık mikroskop ile incelenmiştir. Hematoksilen-Eozin ile boyanan preparatlar ve toluidin mavisi ile boyanan yarı ince kesitler Leica DFC 500 dijital kamera bağlı olan ışık mikroskop ile (Leica DM 3000, Almanya) fotoğraflanmıştır.

TEM analizi sürecinde yarı ince kesitler için hazırlanan bloklardan elde edilen 90 nm kalınlığındaki ince kesitler kullanılmıştır. Yarı ince kesitler ile işaretlenen bölgelerden alınan ince kesitler 100 ya da 200 mesh'lik bakır gridler üzerine alınmıştır. Alınan kesitler kontrast sağlamak amacıyla, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmıştır. Elektron mikroskobu, vasküler dallanma noktalarını görselleştirmek, endotel hücrelerdeki, granül depolayan hücrelerdeki ve koryonik ve allantoik epiteldeki değişiklikleri gözlemek için kullanılmıştır. İnce kesitler Gatan Orius SC-1000 dijital kamera bağlı olan geçirimli elektron mikroskop (Jeol JEM 1400, Japonya) ile incelenmiştir.

RNA İzolasyonu ve Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Analizi

Belirlenen gelişim günlerinde CAM örneklerinden RNA izolasyonu, daha önce tarif edildiği şekilde²³, Trizol solüsyonu (Tri-reagent, Sigma, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Bunun için, E7 ile E20 arasında kalan süreçte CAM örnekleri günlük olarak toplanmıştır (E11, E14, E18 hariç). Toplam RNA konsantrasyonu ve saflığı A260/A280 oranı kullanılarak hesaplanmıştır (>1.8). İki aşamalı RT-PCR reaksiyonu için üretici firmanın (OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit abm, Kanada) önerileri doğrultusunda önce 1 µg total RNA revers-transkriptaz (RT) reaksiyonu için kullanılmıştır ve ardından PCR reaksiyonu ile analizi istenen mRNA'lar amplifiye edilmiştir. RT reaksiyonları termal döngü cihazı kullanılarak iki aşamalı şekilde gerçekleştirilmiştir (Birinci aşama: 1 döngü 65 °C, 5 dakika ve +4 °C, 1 dakika. İkinci aşama: cDNA elde etmek için (ters transkripsiyon), 1 döngü 50 °C, 50 dakika, 85 °C, 5 dakika ve +4 °C, 5 dakika). Elde edilen cDNA ürünleri PCR için kullanıma kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Analizi istenen genler için PCR döngü koşulları optimize edilmiştir ve normalizasyon aşamasında kontrol olarak kullanılan gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) için PCR protokolünde 27 döngü ve analiz edilen diğer tüm genler için 30 döngü optimum olarak belirlenmiştir. Analiz edilen genler ve kullanılan primerler Tablo I'de listelenmiştir. Termal döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilen PCR koşulları şunlardır: 1 döngü, 95 °C, 12 dakika (aktivasyon); 25-30 döngü, 95 °C, 1 dakika (denatürasyon), 55-58 °C, 1 dakika (primerlerin yapışması), 72 °C, 1 dakika (uzama); 1 döngü, 72 °C, 10 dakika (son uzama). Elde edilen

PCR ürünleri +4 °C'de saklanmıştır. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile görselleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin dansitometrik analizleri Image J programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Her gelişimsel güne ait spesifik gen ifadeleri, aynı güne ait GAPDH ölçüm sonucu kullanılarak normalize edilmiştir ve sonuçlar grafikler şeklinde sunulmuştur.

Tablo I. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan primerler.

Hedef Gen	Kullanılan Primer Sekansları	Ürün	Gen Bankası Ulaşım Numarası
VEGF-A	F: CCGAAGCCCAACGAAGTTAT C R: CCTCCCTTTCTCGCTTT	349 bç	NM205042.2 (bu makale)
VEGFR-2	F: AGTCATAGGCAACGACACCG R: TGCACGCTTTTCTTGATGG	529 bç	NM001004368.1 (bu makale)
FGF-2	F: AAGCGCTCTACTGCAAGAA C R: TTGGTCCGGCTTGACTGT	325 bç	NM205433.1 (bu makale)
FGFR-2	F: CAGCTGACTCAAGCTCCTCC R: CACACAGCGGACCATCCTGG	393 bç	NM205319.2 (bu makale)
CNP-3	F: AAGAGAGGGATCGTGAGCAA R: TCCTGGACAGACCCTTTTG	201 bç	XM427055 (23)
NPR-B	F: GCCTGCTCCGAGTACGTG R: GTGCAGGTGGGAGACGAA	252 bç	XM427055 (23)
GAPDH	F: AGTCATCCCTGAGCTGAAG R: AGGATCAAGTCCACAACACG	330 bç	J00849 (23)

*dipnot: F: "Forward" primer, R: "Reverse" primer, bç: baz çifti

Bulgular

CAM Yapısının Işık Mikroskopik Analizi

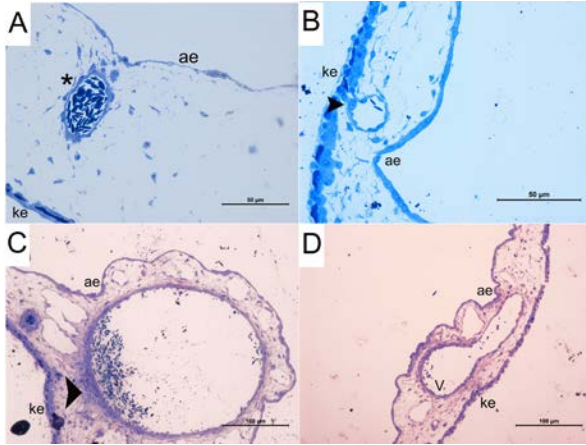
CAM gelişimi sürecindeki yapısal değişimleri incelemek için, Hematoksilen-Eozin ile boyanmış kesitler ve toluidin mavisi ile boyanmış yarı ince kesitler ışık mikroskop kullanılarak analiz edilmiştir. E7'de CAM mezenşimi içinde endotel tüp yapıları gözlenmiştir (Şekil 3A ve B). E12'de ana kan damarlarının çapının arttığı ve mezenşimden farklılaştığı öngörülen düz kas hücreleri ile bu damarların etrafının sarıldığı ve stabili-

lize edildiği gözlenmiştir (Şekil 3C). Sırasıyla E12 ve E13'te CAM yapısı içinde tanımlanmış müsküler arterler (Şekil 3C) ve orta büyüklükte ven yapıları görülmüştür (Şekil 3D).

E15'te, tunika muskularis tabakasındaki düz kas sayısındaki artışla tanımlanan müsküler arterler görüntülenmiştir (Şekil 4A). CAM mezenşim hücre yoğunluğunun ve buna paralel olarak CAM kalınlığının E15 ile E17 arasında arttığı görülmüştür (Şekil 4B ve C). Müsküler arterlerinin yapısı, tunika adventisyannın organizasyonu ile E15-E19 arasında daha fazla gelişme göstermiştir (Şekil 4B-D ve Şekil 5A-B). E20'de kalın bir mezenşim ve incelmış koryonik ve allantoik epitel yapıları gözlenmiştir (Şekil 4E). Ek olarak, gelişimin ileri evrelerinde, CAM mezenşiminde kan damarlarının koryona oldukça yaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4F).

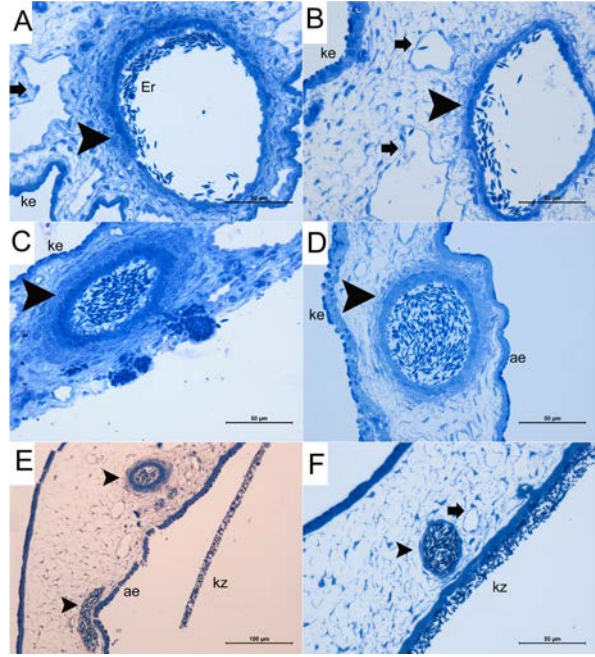
CAM Vasküler Yapısının TEM Analizi

E7'de CAM koryonik epitel altında ve mezenşim içinde endotel tüp yapıları gözlenmiştir (Şekil 6A). Koryonik epitel bu aşamada iki tabakalı olarak gözlenmiş olup, bu hücre tabakaları arasında desmozomlar görülmüştür (Şekil 6A). Ek olarak, hem mezenşim hücrelerinde hem de endotel hücrelerinde perinükleer alanda bulunan belirgin bir granüllü endoplazmik retikulumu (GER) gözlenmiştir (Şekil 6B-D).



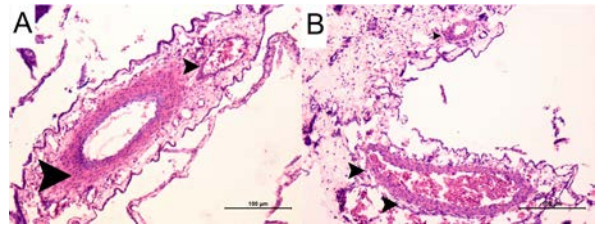
Şekil 3.

Toluidin mavisi boyama metoduyla E7, E12, E13'de boyanan CAM örneklerinin ışık mikroskop ile incelenmesi. E7'de yeni oluşan endotel tüp yapılarının mezenşim içerisinde gösterilmesi (yıldız işareti*) (A, X400). E12'de koryonik epitel altında ve mezenşim tabakasında görülen vasküler yapılar (B, X400). E12'de mezenşimde görülen müsküler arter yapısı (ok başı) (C, X200). E13'de mezenşim tabakasında görülen ven yapısı (D, X200). ae: allantoik epitel, ke: koryonik epitel, Er: eritrositler, V: ven.



Şekil 4.

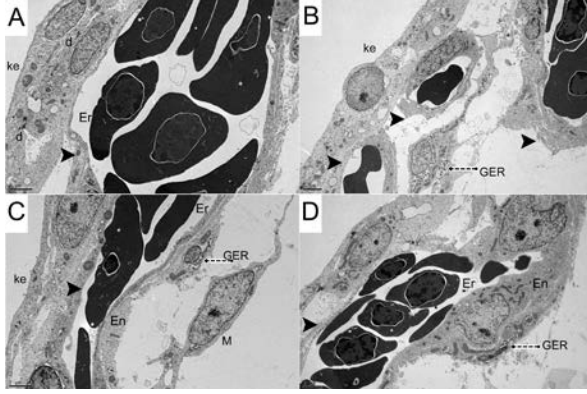
Toluidin mavisi boyama metoduyla E15, E16, E17 ve E19'da boyanan CAM örneklerinin mikroskop ile incelenmesi. E15'te lümeninde eritrositler ve lümen etrafında belirgin tunika media bulunan müsküler arter yapısı (kalın ok başı) komşuluğunda ven yapısı (ok) (A, X400). E16'da mezenşim tabakasında venöz yapılar (oklar) ve gelişmiş müsküler arter (B, X400). E17 ve E19'da mezenşim tabakasında duvar yapısı gelişkin müsküler arter yapıları (kalın ok başı) (C, D, X400) E20'de koryonik epitel altındaki mezenşim tabakasında yoğunlaşan lümeni ve duvarı belirgin damar yapısı (ok başı) ve yanında ince kılcal damar yapısı (ok) görüldü (E, X200 ve F, X400). ae: allantoik epitel, ke: koryonik epitel, Er: eritrositler, kz: kabuk zarı



Şekil 5.

Hematoksilen-Eozin boyama metodu kullanılarak E16'da boyanan örneklerin ışık mikroskop ile incelenmesi. E16'da CAM mezenşim içerisinde yer alan çeşitli boyutlarda vasküler yapıların gösterilmesi (ok başları) (A, B X200).

Anjiyogenez Sürecinde CNP-3 ve NPR-B Ekspresyonu

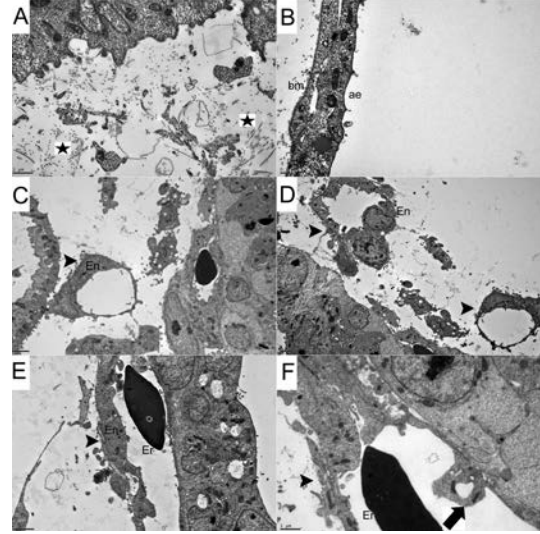


Şekil 6.

E7'de CAM örneklerinin ince yapısının TEM ile incelenmesi. CAM yapısındaki damarlar. Koryonik epitelin iki katlı görünümü ve desmozomlar (A, X8000). Koryonik epitele komşu lokalizasyonda kılcal damar yapıları (ok başı) (B, X6000). Koryona komşu yerleşimli damar endotelinin yakınına yerleşmiş mezenşim hücresi ve belirgin GER yapısı (C, X8000). Perinükleoler bölgeye lokalize GER yapısı (kesikli ok) belirgin endotel ile çevrili kan damarı (D, X6000). ke: koryonik epitel, M: mezenşim hücresi, Er: eritrositler, En: endotel hücresi, d: desmozom, GER: granüllü endoplazmik retikulumu.

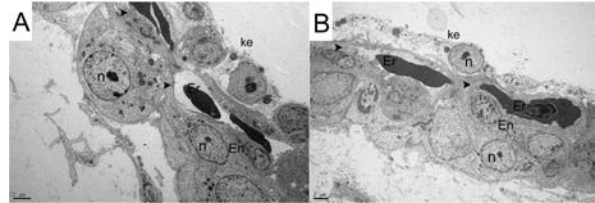
E8'de, CAM mezenşim tabakasında artmış kolajen sentezi görülmüştür (Şekil 7A). Allantoik epitel hücreleri ve bazal lamina arasındaki desmozomlar, E8'de açıkça gözlenmiştir. Allantoik epitelde beklenildiği gibi damar oluşumuyla ilgili herhangi bir yapı gözlenmezken, lipid damlacıklarının varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 7B). Kan damarları, E8'de mezenşim içerisinde kolayca ayırt edilebilmiştir (Şekil 7C). Mezenşimde görülen bu kan damarları belirgin endotel hücrelerine sahiptir (Şekil 7D). Ek olarak, koryonik epitel ile yakın temas halinde endotel tüp yapıları gözlenmiştir (Şekil 7E) ve bu oluşumlarda intussuseptif anjiyogenezi düşündürülen sütun benzeri oluşumlar görülmüştür (Şekil 7F).

Koryonik epitel, E12'de çok katmanlı bir yapıda görülmüştür. Koryonik epitel komşuluğunda gelişen CAM vasküler yapıları devamlı şekilde endotel tüpleri olarak gözlenmiştir (Şekil 8A). Ayrıca, bu kılcal damarlar, E7'ye kıyasla koryonik epitelin yüzeyine çok daha yakın yerleşim göstermektedir (Şekil 8B). Ayrıca endotel hücrelerde heterokromatin E15'te kan damarlarının etrafındaki perivasküler hücrelerin artışı görülmüştür. E15'te vasküler organizasyonun küçük çaplı vasküler yapılara kadar ilerlediği, bu yapıların duvarlarında perisitlerin, lümenlerinde ise eritrositlerin yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 9A). Vasküler yapılara komşu eozinofilik hücrenin varlığı görülmüştür (Şekil 9A). Özetle, bu aşamada koryonik epitele komşu vasküler organizasyonda artış dikkati çekmiştir (Şekil 9B).



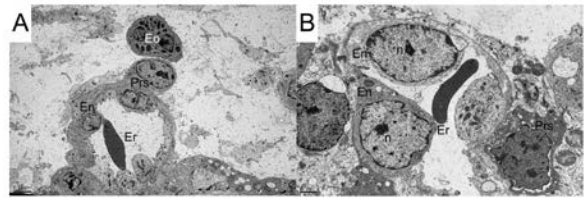
Şekil 7.

E8'de CAM örneklerinin ince yapısının TEM ile incelenmesi. Mezenşim tabakasında kolajen lifleri (yıldız işareti *) (A, X15000). Desmozomlar, lipid damlacıkları ve belirgin bazal membran (B, X20000). Mezenşim içerisinde vasküler yapılar (C, X6000, D, X5000, E, X8000). Endotel hücrelerinde oluşan sütun benzeri yapı (kalın ok) (F, X15000). ae: allantoik epitel, bm: bazal membran, d: desmozom, Er: eritrositler, En: endotel hücresi.



Şekil 8.

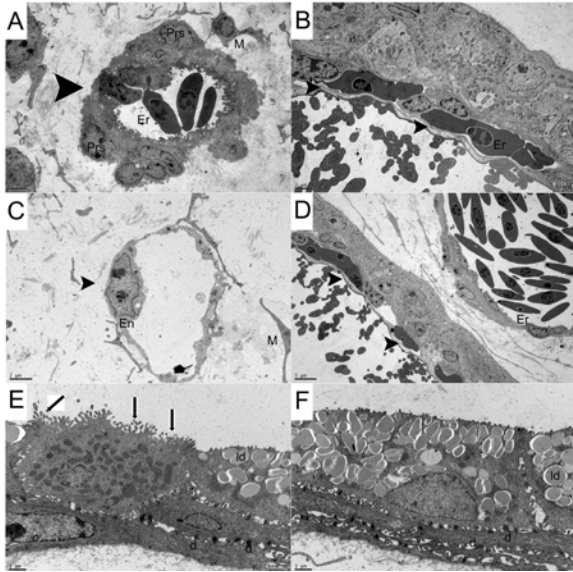
E12'de CAM örneklerinin ince yapısının TEM ile incelenmesi. Koryonik epitel hücreleri arasında sayıca artan ve yüzeye yakın konumlanan kılcal vasküler yapılar (ok başı ile gösterilen) (A, X6000 ve B, X5000). Ayrıca E12'de nükleolus (n) yapıları belirgin görülen koryonik epitel hücreleri gözlenmiştir. ke: koryonik epitel, Er: eritrositler, En: endotel hücresi, n: nükleolus.



Şekil 9.

E15'de CAM örneklerinin ince yapısının TEM ile incelenmesi. Eozinofil benzeri hücre komşuluğunda, perisitler ile çevrilmiş bulunan vasküler yapı (A, X6000). Nükleolus (n) yapıları belirgin endotel ile çevrilmiş bir lümeni ve perisitleri bulunan vasküler yapı (B, X12000). Er: eritrositler, n: nükleolus, En: endotel hücresi, Prs: perisit, Eo: eozinofil benzeri hücre.

E20'de E15'e göre daha gelişmiş ve mezenşime yerleşmiş kan damarları görülmüştür (Şekil 10A). Ayrıca, koryonik epitel altında ve yakın komşuluğunda yayılım gösteren endotel tüp yapısındaki kan damarları da gözlenmiştir (Şekil 10B). CAM mezenşiminde farklı büyüklükte kan damarları görülmüştür (Şekil 10C-D). Bu durum vasküler organizasyonun kompleks bir yapıya eriştiğini düşündürmüştür. E20 için en çarpıcı bulgu, hem allantoik hem de koryonik epitelin çok katmanlı yapısının ve bu epitel hücreleri arasında desmozomların gözlenmiş olmasıdır. Koryonik epitel yüzeyindeki parmak benzeri uzantılarla çok katlı bir görünüm sergilerken (Şekil 10E); allantoik epitel daha fazla katlı bir görünüme sahip olarak görüntülenmiştir (Şekil 10F).



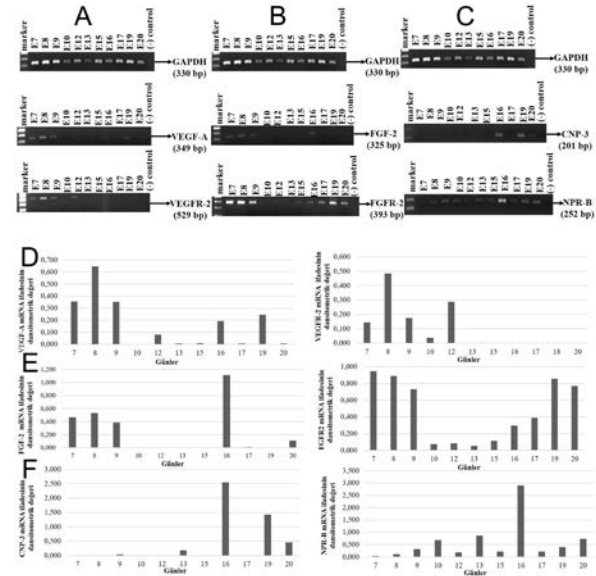
Şekil 10.

E20'de CAM örneklerinin ince yapısının TEM ile incelenmesi. Mezenşim içinde etrafında perisit ve mezenşim hücresi görülen arter benzeri gelişmiş vasküler yapı (A, X6000) ve koryonik epitel komşuluğunda sayıca artış gösteren kapiller vasküler yapılar (ok başı) (B, X6000). Mezenşim içerisinde bir vasküler yapı (C, X8000) ve mezenşimde daha kalın bir duvara ve geniş lümeneye sahip kan damarı (D, X3000). Koryonik epitelin yüzeyinde parmaklı çıkıntılar (oklar) dik-kati çekmiştir (E, X12000). Desmozomlar en çok, katmanlı allantoik epitelde görülmüş ve allantoik epitelde artmış lipid damlacıkları (ld) sayısı gözlenmiştir (F, X12000). Er: eritrositler, En: endotel hücresi, Prs: perisitler, M: mezenşim hücresi, d: desmozom, ld: lipid damlacıklar

CAM Örneklerinde VEGFA, FGF-2, CNP-3 ve Bu Ligandların Reseptörlerinin Zamana Bağlı mRNA İfadelerinin Analizi

CAM gelişimi sürecinde görülen vasküler yapılanmaya paralel olarak, VEGF-A (Şekil 11A), FGF-2 (Şekil 11B) ve CNP-3 (Şekil 11C) ve bu ligandların reseptörleri olan VEGFR-2 (Şekil 11A), FGFR-2 (Şekil 11B)

ve NPR-B'nin (Şekil 11C) zamana bağlı mRNA ifade düzeyleri RT-PCR ve etidyum bromür boyalı agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. Elde edilen dansitometrik analiz sonuçları aynı zaman noktalarına karşılık gelen GAPDH ölçüm değerleri kullanılarak normalize edilmiştir.



Şekil 11.

E7-E20 sürecinde (E11, E14, E18 hariç) VEGF-A/VEGFR-2 (A), FGF-2/FGFR-2 (B) ve CNP-3/NPR-B (C) RT-PCR analizlerinin agaroz jel görüntüleri. E7-E20 sürecinde (E11, E14, E18 hariç) VEGF-A/VEGFR-2 (D), FGF-2/FGFR-2 (E) ve CNP-3/NPR-B (F) mRNA ifadelerinin dansitometrik analiz sonuçları (sonuçlar aynı zaman noktasındaki GAPDH mRNA ifade düzeyine göre normalize edilmiştir).

VEGF-A ve FGF-2 mRNA ifadesi, reseptörleri ile uyumlu olacak şekilde E7-E9'da gözlenmiş olup, E8'de pik yaptıkları görülmüştür (Şekil 11D-E). VEGF-A ve FGF-2'nin mRNA ifade düzeylerinin E10-E15 arasında azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 11D-E). VEGF-A mRNA ifadesinde E16-E19 arasında ikinci bir artış gözlenmiş olmasına rağmen, VEGFR-2 mRNA ifadesi E12'den sonra azalmış ve kaybolmuştur (Şekil 11D). FGF-2 mRNA ifadesi E16'da ikinci bir artış gösterirken, FGFR-2 mRNA ifadesi E15-E20 arasında kademeli olarak artmış ve ikinci kez en yüksek seviyesine E19'da ulaşmıştır (Şekil 11E).

CNP-3 mRNA ifadesi ilk olarak E13'te gözlenmiş olup, en yüksek seviyesine E16'da ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 11F). NPR-B mRNA ifadesinin ise tüm CAM gelişimi boyunca gözlenmesine rağmen en yüksek seviyesine, ligandı olan CNP-3 mRNA ifadesine paralel olarak, E16'da ulaştığı gözlenmiştir (Şekil 11F).

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, tavuk embriyosu modeli kullanılarak, E7-E20 arasında CAM üzerinde görülen anjiyogenez süreci ışık ve transmisyon elektron mikroskop analizleri ile takip edilmiştir. Ayrıca, aynı günlerde alınan CAM örnekleri kullanılarak, anjiyogenez mekanizmalarında rol aldığı bilinen faktörlerin (VEGF-A ve FGF-2) ve reseptörlerinin (VEGFR-2 ve FGFR-2) yanı sıra, insan CNP homologu olan tavuk CNP-3 ve reseptörü NPR-B'nin mRNA ifade düzeylerinin zamana bağımlı değişimi analiz edilmiştir. Çalışmanın amacı, CNP-3'ün ve reseptörü olan NPR-B'nin CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenez sürecindeki mRNA ifade profilini, dolayısıyla süreçteki olası katkısını zamansal açıdan analiz etmek ve tanımlamak olarak planlanmıştır.

Literatürde CAM gelişimi, koryonik ve allantoik epitel ve bunların mezenşim tabakalarının morfolojisi ve moleküler özellikleri dikkate alınarak evrelendirilmiştir^{41,50}. Bu evreleme genellikle gelişimin erken, ileri ve geç aşamaları şeklinde ifade etmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda, CAM yapısında anjiyogenezi aşamalandırmak için ışık mikroskop analizleri kullanılmıştır. Sonuç olarak, damarların gelişim düzeyi ve damar duvarının yapısı ve kalınlığı dikkate alınarak çalışmamızda E7-E12 erken, E13-E18 ileri ve E18-E20 anjiyogenezin geç evreleri olarak belirlenmiştir.

VEGF-A, anjiyogenez sürecinde reseptörlerinden biri olan VEGFR-2 aracılığıyla endotel hücre proliferasyonunu, göçünü ve endotel hücre sağkalımını sağlayarak önemli bir rol oynamaktadır^{4,5}. Bu nedenle CAM vasküler gelişimi üzerine yapılan çalışmalar VEGF-A üzerinde yoğunlaşmıştır⁴¹. Bu çalışmada gösterilen ve E7-E9 arasında, diğer bir deyişle CAM vasküler gelişiminin erken döneminde artan VEGF-A mRNA ifadesi literatürle uyum göstermektedir^{41,51}. Bu veriler, E7-E12 arasındaki süreçte, mezenşimde endotel tüplerin varlığını gösteren ışık mikroskop analizlerimizle de desteklenmiştir (Şekil 3A-B). Anjiyoplastik hücrelerin, VEGF-A sinyali ile proliferen olan ve vaskülogenez/anjiyogenez süreçlerine katılan endotel hücrelere farklılaştığı düşünülmüştür. E7-E12 arasında VEGF-A'ya eşlik eden VEGFR-2 mRNA ifade profili de sonuçları desteklemektedir (Şekil 11D). Bu erken dönem, yeni kan damarlarının oluşumu ve gelişmesi, yani vaskülogenez oluşması ve anjiyogenezin başlaması için uygun zaman olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, E7'de görülen ve özellikle kan damarlarının endotel hücrelerinde bulunan perinükleer bölgede belirgin olan granüllü endoplazmik retikulumu (GER) yapısı, VEGF-A ve FGF-2 sentezini kapsadığı düşünülen protein sentezi ile ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, damar oluşumu ve gelişiminde endotel hücre filizlenmesi aracılığıyla gerçekleşen anjiyogenezde VEGF-A ve VEGFR-2 arasındaki ilişkinin uyumluluğunu CAM

anjiyogenezi için de desteklemektedir. Özellikle, E12'de gözlenen koryonik epitelten tomurcuklanan endotel tüp yapılarının varlığı henüz oluşmaya başlayan kan damarlarını ve bu damarlardan anjiyogenez ile gelişen damarların organizasyonunu işaret etmektedir (Şekil 3B). Ayrıca, E8'de gözlemlenen sütun benzeri yapılar, bu dönemde literatürde gösterilen⁴¹ ve VEGF-A ile ilişkili olduğu belirtilen intussuseptif anjiyogenez ile de ilişkilendirilebilir. Ancak burada intussuseptif anjiyogenez konusunda daha net bilgiler elde edebilmek için ileri çalışmalara ve seri kesitlerin analizine ihtiyaç duyulmaktadır.

FGF-2, hem erken hem de geç anjiyogenezde rol oynamaktadır ve etkisini VEGF-A gibi diğer anjiyogenik faktörlerin ifadesini kontrol ederek göstermektedir^{52,53}. FGF-2'nin bu anjiyogenik etkisi, *in vitro* çalışmalarda CAM modeli kullanılarak da incelenmiştir^{44,51,54}. Çalışmamızda, FGF-2 mRNA ifadesi ilk olarak E7-E9 arasında ve ikinci olarak E16-E20 arasında olmak üzere iki pik düzey göstermiştir (Şekil 11E). FGF-2, endotel hücrelerinin proliferen olduğu, göç ettiği ve anjiyogenez aracılığıyla yeni tübül yapılarını oluşturduğu düşünülen bu günlerde VEGF-A ile birlikte ifade edilmektedir. FGF-2 ve VEGF-A mRNA ifadelerinin, CAM gelişiminin erken aşamalarında birbirleriyle örtüşmekte olduğu gösterilmiştir (Şekil 11D-E). E7-E9 arasında CAM yapısında yeni damarların oluşumunun gözlenmesi, FGF-2'nin bir endotel hücre mitojeni olarak VEGF-A ile sinerjistik etkiler gösterebileceği hipotezini desteklemektedir. Ayrıca FGF-2'nin yalnızca endotel hücreler üzerinde mitojenik etkileri yoktur. Fibroblastların çoğalmasında düzenlediği bilinmektedir. FGF'in fibroblastlar üzerindeki bu etkisinin, E15 ile E17 arasında mükül arter yapısı gösteren ileri arterlerin duvar yapılarında yer alan düz kas ve bağ doku tabakalarının organizasyonunu açıklayabileceği düşünülmüştür. FGF-2 ve FGFR-2'nin her ikisi de endotel hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde ifade edilmektedir. FGF-2, bu reseptörü aracılığıyla endotel hücreleri üzerindeki etkisini göstermektedir^{17,55}. FGFR-2 mRNA ifadesi, E7-E9 arasında ve E16'da kendi ligandı ile eşzamanlı olacak şekilde gösterilmiştir (Şekil 11E). Bu gözlem, FGF-2'nin FGFR-2 ile damar gelişiminin ileri evresinde etki gösterdiği hipotezini güçlendirmektedir.

E20'de CAM mezenşim içerisinde hem büyük lümenli ve gelişkin duvar yapısına sahip mükül arterlerin, hem de küçük lümenli ve ince duvar yapısına sahip vasküler yapıların varlığı gözlenmiştir. Ayrıca, koryon epiteline komşu arterioller ve kapiller vasküler yapılar da gözlenmiştir. Vasküler yapıların bu şekilde farklı büyüklük ve konumlarda düzenlenmesi ve kompleks bir yapıya değişimi, muhtemelen yumurtadan çıkmadan önce civcivin artan oksijen ihtiyacıyla ilişkilendirilmektedir.

CNP'nin kardiyovasküler sistemde rolü olduğu bilinmektedir³⁰. CNP'nin, insan aortik endotel hücrelerin-

den elde edilen hücre kültüründe ifade edildiği gösterilmiştir²⁴. Ayrıca CNP reseptörlerinden biri olan NPR-B'nin sadece merkezi sinir sisteminde bulunmadığı; aynı zamanda kan damarlarında da ifade edildiği bulunmuştur²⁸. Bu nedenle, CNP'nin reseptörü NPR-B aracılığıyla kardiyovasküler bir role sahip olduğu düşünülmektedir⁵⁶. Ek olarak, CNP'nin NPR-C yoluyla vasküler fonksiyonu düzenleme, vasküler yeniden modelleme ve anjiyogenezi düzenleme üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir³¹. Çalışmamızda, CNP-3'ün ve reseptörü olan NPR-B'nin CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenezi sürecindeki mRNA ifade profilini, dolayısıyla süreçteki olası katkısını zamansal açıdan analiz etmek ve tanımlamak amaçlanmıştır.

CAM yapısı içerisinde görülen anjiyogenezi sürecinde CNP-3 mRNA ifadesi ilk olarak E13'de görülmüş olup, E16'da pik seviyesine ulaşmıştır (Şekil 11F). E16'da FGF-2 ve CNP-3'ün eş zamanlı ifade edildiği gözlenmiştir (Şekil 11E-F). Bu sonuçlar, FGF-2 ve CNP-3'ün, CAM gelişimi ve ileri vasküler organizasyon sürecinde anjiyogenezin ileri ve geç aşamalarında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, E16'da embriyonun artan büyüklüğüne paralel olarak artan oksijenizasyon ihtiyacının da CNP-3 ve FGF-2 ifadesini uyarmış olabileceği yorumlanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma, VEGF-A ve FGF-2 tarafından düzenlenen anjiyogenik sinyal yollarına paralel olarak, CAM yapısında görülen anjiyogenezi sürecinde CNP-3/NPR-B sinyal yolağının da etki mekanizmasını araştırabilecek gelecekteki çalışmaların temelini oluşturmaktadır. CAM vasküler gelişimi sırasında CNP-3/NPR-B sinyal yolağının anjiyogenezi sürecindeki etki mekanizmasını açıklayabilmek için daha fazla fonksiyonel çalışmaya ihtiyaç vardır.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Onaylayan Kurul: Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Araştırma Kurulu

Onay Tarihi: 14.10.2020

Karar No: 12/10/2020 tarih ve 20/14 sayılı karar

Araştırmacı Katkı Beyanı:

Fikir ve tasarım: A.Ç.T., E.E.; Veri toplama ve işleme: A.Ç.T., E.E., F.F.K.; Analiz ve verilerin yorumlanması: A.Ç.T., E.E., A.D.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: A.Ç.T., E.E., A.D., F.F.K.

Destek ve Teşekkür Beyanı:

Bu makalede yer alan çalışmalar DA20/14 nolu proje kapsamında Başkent Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Uzman Biyolog Ece Lakşe Coşar'a elektron mikroskop numunelerinin hazırlanmasında verdiği destekten dolayı teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı:

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1097-1103.
2. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 1989; 251: 224-231.
3. Risau, W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development; in Feinberger, R.N., G.K. Sherer, R. Auerbach (eds): *The Development of the Vascular System. Issues in Biomedicine*. Basel Karger 1991; 14: 58-68.
4. Edward MC, De'sire' C, Peter C. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* 2001; 49: 507-521.
5. Naito H, Iba T, Takakura N. Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *Int Immunol* 2020; 32: 295-305.
6. Giles JJ, Bannigan JG. The effects of lithium on vascular development in the chick area vasculosa. *J Anat* 1999; 194: 197-205.
7. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neuro-oncol* 2000; 50: 1-15.
8. Tufan A.C., Satiroglu-Tufan N.L. The effect of ethanol exposure on extraembryonic vascular development in the chick area vasculosa. *Cells Tissues Organs* 2003; 175:85-97
9. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
10. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6(4): 389-95.
11. Kachooei SA, Rahmani R, Zareh N, et al. Down-regulation of TGF-β, VEGF, and bFGF in vascular endothelial cells of chicken induced by a brittle star (*Ophiocoma erinaceus*) extract. *Heliyon* 2020; 6: e03199.
12. Cêbe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(5): 601-615.
13. Cao R, Eriksson A, Kubo H, et al. Comparative Evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circulation Research* 2004; 94:664-670.
14. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 14;407(6801):242-8.
15. Leconte I, Fox JC, Baldwin HS, et al. Adenoviral-mediated expression of antisense RNA to fibroblast growth factors disrupts murine vascular development. *Dev Dyn*. 1998; 213: 421-30.
16. Lee SH, Schloss DJ, Swain JL. Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 33679-87.
17. Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med*. 2002; 8: 483-9.
18. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, et al. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997; 18: 26-45.
19. Bahramsoltani M, Spiegelaere WD, Janczyk P, et al. Quantitation of angiogenesis in vitro induced by VEGF-A and FGF-2 in two different human endothelial cultures – an all-in-one assay. *Clin Hemorheol and Microcirc* 2010; 46:189-202.
20. Joseph-Silverstein J, Rifkin DB. Endothelial cell growth factors and the vessel wall. *Semin Thromb Hemost* 1987; 13: 504-13.
21. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 217-39.

Anjiyogenez Sürecinde CNP-3 ve NPR-B Ekspresyonu

22. Olney RC, Bukulmez H, Bartels CF, et al. Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor- B (NPR2) are associated with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1229–1232.
23. Alan T, Tufan AC. C-Type Natriuretic Peptide Regulation of Limb Mesenchymal Chondrogenesis is Accompanied by Altered N-Cadherin and Collagen Type X-Related Functions. *J Cell Biochem* 2008; 105: 227-235.
24. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, et al. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 1992; 263: H1318-21.
25. Špiranec K, Chen W, Werner F, et al. Endothelial c-type natriuretic peptide acts on pericytes to regulate microcirculatory flow and blood pressure. *Circulation* 2018; 138: 494-508.
26. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 2006; 27: 47-72.
27. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide c receptor signaling in the heart and vasculature. *J Physiol* 2008; 586: 353–366.
28. Suga S, Nakao K, Itoh H, et al. Endothelial production of c-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J Clin Invest.* 1992; 90: 1145-9.
29. Moyes AJ, Hobbs AJ. C-type natriuretic peptide: a multifaceted paracrine regulator in the heart and vasculature. *Int J Mol Sci.* 2019; 20: 2281.
30. Lumsden NG, Khambata RS, Hobbs AJ. c-type natriuretic peptide (CNP): cardiovascular roles and potential as a therapeutic target. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 4080-8.
31. Bubb KJ, Aubdool AA, Moyes AJ, et al. Endothelial c-type natriuretic peptide is a critical regulator of angiogenesis and vascular remodeling. *Circulation.* 2019; 139: 1612-1628.
32. Umaru B, Pyriochou A, Kotsikoris V, et al. ATP-sensitive potassium channel activation induces angiogenesis in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 354: 79-87.
33. Woodard GE, Rosado JA, Brown J. Expression and control of c-type natriuretic peptide in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R156-65.
34. Houweling AC, Somi S, Massink MP, et al. Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of *cnp-3* in chicken. *Dev Dyn* 2005; 233: 1076–1082.
35. Kocamaz E, Gok D, Cetinkaya A, et al. Implication of c-type natriuretic peptide-3 signaling in glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte hypertrophy during TGF- β 1 induced chondrogenic differentiation of chicken bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Mol Histol* 2012; 43: 497-508.
36. Merckx G, Tay H, Lo Monaco M, et al. Chorioallantoic membrane assay as model for angiogenesis in tissue engineering: focus on stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* 2020; doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0048.
37. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 2016; 141: 70-77.
38. Patrycja NS, Tatiana S, M. Luisa IA. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 2014; 17: 779-804.
39. Ergin C, Tufan AC, Yılmaz C. Bartonella Henselae tarafından uyarılan anjiyogenezin, in vivo model olarak yumurta açığında, kabuksuz tavuk embriyosu kültürü üzerinde, koryoallantoik membranda gösterilmesi. *Nobel Med* 2012; 8: 108-112.
40. Tufan AC, Satiroglu-Tufan NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; 5: 249-66.
41. Baum O, Suter F, Gerber B, et al. VEGF-A promotes intussusceptive angiogenesis in the developing chicken chorioallantoic membrane. *Microcirculation* 2010; 17: 447–457.
42. Richardson, M.; Singh, G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Curr. Drug Targets-Cardiovasc. Haematol. Disord* 2003; 3:155-185.
43. Ribatti D, Nico B, Vacca A, et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat. Rec* 2001; 264:317-324.
44. Ribatti D, Presta M. The role of fibroblast growth factor-2 in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *J. Cell Mol. Med.* 2002; 6: 439-446.
45. Schlatter P, König MF, Karlsson LM, et al. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvasc. Res.* 1997; 54: 65-73.
46. Miller SA, Bresee KL, Michaelson CL, et al. Domains of differential cell proliferation and formation of amnion folds in chick embryo ectoderm. *Anat. Rec* 1994; 238: 225-236.
47. DeFouw DO, RizzoVJ, Steinfeld R, et al. Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis. *Microvasc. Res* 1989; 38: 136-147.
48. Wangenstein D, Weibel ER. Morphometric evaluation of chorioallantoic oxygen transport in the chick embryo. *Respir. Physiol.* 1982; 47: 1-20.
49. Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev. Biol* 1974; 38: 237-248.
50. Makanya AN, Dimova I, Koller T, et al. Dynamics of the developing chick chorioallantoic membrane assessed by stereology, allometry, immunohistochemistry and molecular analysis. *PLoS One.* 2016; 5: e0152821.
51. Marinaccio C, Nico B, Ribatti D. Differential expression of angiogenic and anti-angiogenic molecules in the chick embryo chorioallantoic membrane and selected organs during embryonic development. *Int J Dev Biol* 2013; 57: 907-16.
52. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16: 159-78.
53. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, et al. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFR-beta signaling. *J Cell Sci* 2005; 118: 3759-68.
54. Ribatti D, Urbinati C, Nico B, et al. Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Dev Biol.* 1995; 170: 39-49.
55. Yang X, Liaw L, Prudovsky I, et al. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature. *Curr Atheroscler Rep* 2015; 17: 509.
56. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology.* 2001; 142: 1578-86.

