

Anjiyogenezde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran

Taner Özgürtaş (*)

ÖZET

Anjiyogenez, yeni kapiller oluşumu ile seyreden biyolojik bir süreçtir ve bazı fizyolojik ve patolojik durumlarda ortaya çıkmaktadır. Anjiyogenez pozitif ve negatif düzenleyici aktiviteye sahip moleküller arasındaki net dengeyle kontrol edilir. İnsan sağlığı açısından yeni damar oluşumu (anjiyogenez) ve kan damarlarının yayılımının kontrolü (anti-anjiyogenez) oldukça önemlidir. Bu nedenle, anjiyogenez aktif bir araştırma alanıdır. In vitro modeller, bu süreci tarif etmede faydalı olsalar da, in vivo ne olduğunu yansıtmayabilir. Anjiyogenez araştırmalarında çok yaygın olarak kullanılan, yoğun vaskularize civciv embriyo koriyoallantoik membran modeli, faydalı bir in vivo sistemdir. Civciv koriyoallantoik membran ölçümünün anjiyojenik yanıt açısından fiyat-etkin, basit, güvenilir ve tekrarlanabilir olması, araştırmacılar için çekici özellik taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: *Anjiyogenez, anti-anjiyogenez, koriyoallantoik membran*

SUMMARY

An in vivo model for angiogenesis: chick chorioallantoic membrane

Angiogenesis is a biological process by which new capillaries are formed and it occurs in some physiological and pathological conditions. Angiogenesis is controlled by the net balance between molecules that have positive and negative regulatory activity. The process of building new blood vessels (angiogenesis) and controlling the propagation of blood vessels (anti-angiogenesis) are fundamental to human health. For this reason, the study of angiogenesis is an active area of research. In vitro models, although useful in delineating parts of this process, may not be representative of what occurs in vivo. The highly vascularized chick embryo chorioallantoic membrane model, which is being extensively used in the research of angiogenesis is a useful in vivo system. That chick chorioallantoic membrane assay is cost-effective, simple, reliable and reproducible regarding angiogenic response, attracts investigators.

Key words: *Angiogenesis, anti-angiogenesis, chorioallantoic membrane*

Anjiyogenez ve modelleme

Anjiyogenez (neovaskularizasyon) embriyogenez döneminde baskın olarak, yetişkinlerde ise fizyolojik damar yeniden oluşum sürecinde ve bazen de tümör gelişimi ve diyabetik retinopati gibi bazı patolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (1). Bu nedenle, anjiyogenez çalışmaları aktif bir araştırma alanıdır. Gelecek dekadlarda anti- veya pro-anjiyojenik tedavilerden fayda görecektir insan sayısının 500 milyonun üzerinde olacağı düşünülmektedir (2). Kan damarı oluşumu, birçok hücre tipinin ve çok sayıda molekülün katıldığı kompleks ve çok basamaklı bir süreçtir. Anjiyogenez, süreci pozitif ve negatif etkileyen moleküller arasındaki dengeye bağlı kontrol edilir. Bu konsept, "anjiyojenik anahtar (switch)" olarak adlandırılır (3). Pozitif etkili pro-anjiyojenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Dokuların ve moleküllerin heterojenitesini ve anjiyojenik reaksiyonların hücresel karmaşıklığını düşündüğümüzde, araştırma açısından tamamıyla yeterli tek bir ölçüm yönteminin optimal şartları karşılamaşının mümkün olamayacağı açıktır. Bu nedenle, araştırma amaçlı birçok in vitro ve in vivo anjiyogenez çalışma modeli önerilmiştir. Anjiyogenez süreciyle ilgili in vitro modeller önemli bilgiler sunmakla birlikte, in vivo etkinin ne olacağını tam olarak gösteremez. Anjiyogenez araştırmalarında kullanılan in vivo modellerin bir kısmı, tarama amaçlı kullanılırken, diğerleri doz-etkinlik, moleküler yapısal aktivite ve birden çok ajanın anjiyogenez üzerine kombine etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır (2).

Anjiyogenezde kullanılan başlıca in vivo modeller:

- Civciv koriyoallantoik membran modeli (CAM)
- Tavşan kornea modeli ("micropocket")
- Rodent mezenter modeli
- Sünger ("Sponge") implant modeli
- Matrijel ve klasik tümör modeli
- Zebrabalık modeli

* GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı
Bu makale, VII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde (19-22 Nisan 2007, Antalya) poster bildirisi olarak sunulmuştur

Ayrı basım isteği: Dr. Taner Özgürtaş, GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, Etlik-06018, Ankara
E-mail: tozguntas@gata.edu.tr

Ancak uygulanması en kolay, basit, tekrarlanabilir ve anjiyojenik cevabın kantitatif ölçümüne imkan veren çalışma modellerinin CAM ve tavşan kornea yöntemleri olduğu kabul edilmektedir (4,5). Anjiyogenezde tarama amaçlı ve en çok kullanılan modellerin CAM, tavşan kornea ve matrijel modelleri olduğu bildirilmektedir (6).

İdeal anjiyogenez çalışma modelleri aşağıdaki ihtiyaçları karşılamalıdır:

- Anjiyojenik/anti-anjiyojenik ajanın salıverilme oranı ("release rate") tahmin edilebilmelidir
- Model, yeni damar oluşumunun kantitatif ölçümüne imkan sağlamalıdır (vasküler uzunluk, volüm, damar ağındaki damarların sayısı, bazal membranın genişliği gibi)
- Model, yeni damarın fonksiyonel karakteristiklerinin ölçümünü sağlamalıdır (Endotel hücresi migrasyon, proliferasyon oranı, tüp oluşum oranı, kan akım oranı ve vasküler permeabilite gibi)
- Yeni oluşan damarlarla var olan damarlar kolayca ayırt edilebilmelidir
- Yeni damar oluşumuna neden olabileceği için doku hasarlanmasından kaçınılabilmelidir
- Herhangi bir in vitro yanıt, modelde in vivo olarak gösterilebilmelidir.
- Model, uzun süreli ve noninvaziv monitörizasyona izin vermelidir
- Aynı zamanda yöntem, maliyet uygun, hızlı, kolay uygulanabilir, tekrarlanabilir ve güvenilir olmalıdır

Yukarıda sayılan nedenler dikkate alındığında, CAM modeli uygun bir in vivo model olarak, kanser davranışlarının ortaya konmasında, biyomateryallerin etkilerinin incelenmesinde, fotodinamik tedavi yaklaşımlarında ve en son olarak anjiyogenezde sıklıkla kullanılan uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır (7). Aslında CAM modeli, 1956'dan bu yana metastaz ve kanser çalışmalarında kullanılmaktadır. Folkman tarafından 1976 yılında anjiyogenez çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (8). CAM ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiyogenez hem de anti-anjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. CAM'ın civciv için fizyolojik önemi, gaz alış-verişinde majör solunumsal organ olması ve atık ürünler için mesane görevi görmesidir (9).

CAM'da anjiyogenez, gelişimsel olarak 3 safhadan oluşur:

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

Erken fazda, kapiller ağ filizlenmeye başlar. Ara fazda, mikrovasküler ağda gelişim öne çıkar, filizlenme bu aşamada sona erer. Son fazda, koriyoallantoik öge-

ler tam bir koruyucu membrana dönüşür ve genişlemesi tamamlanır. CAM modelinde, uygulamaların 5. günden itibaren yapılabileceğini savunanlar olduğu gibi (10), damarlanmanın olgunlaştığı 12. günden sonraki dönemin uygulamalar açısından daha iyi bir zamanlama olduğunu ifade edenler de vardır (7). Uygulamaların 18. güne kadar yapılabilmesi mümkündür ancak, bu günden sonra embriyonun yeterince büyümesi ve hareketlerinin artması, uygulamaları olumsuz etkilemektedir.

CAM uygulamalarının dezavantajları

Bu çalışmaların en temel kısıtlaması, nonspesifik inflamasyon reaksiyonlarıdır. Fiziksel ve kimyasal travma hücrel hasarlanmaya ve inflamasyonun tetiklenmesine neden olur. Bu nedenle travma bazlı ölçümler, çalışmanın duyarlılığını ve özgüllüğünü düşürür. Bu nedenle, inflamatuvar süreçlerden kaçınmak ve uzak durmanın gerekliliği açıktır. Bunlar bazen yumurtanın kırık kabuk parçalarından dahi başlayabilir, o yüzden mümkün olduğunca temiz çalışılması önerilir (Şekil 1).

Bir diğer kısıtlama, gerçek neovaskülarizasyonun artmış vasküler dansiteden ayırt edilme güçlüğüdür. Aynı zamanda, gelişmeleri görüntüleme güçlükleri de çalışmaları zorlaştırmaktadır.

Uygulama sonrası değerlendirmelerin yapılacağı zaman konusunda da çeşitli farklı fikirler olmasına karşın, eğer anjiyojenik bir ajan deneniyorsa 72-96 saat sonra değerlendirmenin aksine, anti-anjiyojenik bir ajan deneniyorsa 48 saat sonra sonuçları değerlendirmenin uygun olduğu kabul edilmektedir (8).

Bir diğer konu ise, kabuk kırıldıktan sonra havayla temasın çok iyi bir şekilde önlenmesi ve izolasyonudur. Sonuçların değerlendirileceği döneme kadar ka-



Şekil 1. Koriyoallantoik membranda inflamatuvar süreci tetikleyecek kırık kabuk parçası (GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarı CAM çalışmaları arşivinden alınmıştır)



Şekil 2. Uygulama sonrası CAM yüzeyi ile havanın temasının kesilmesi gerekir (GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarı CAM çalışmaları arşivinden alınmıştır)

bukta açılan pencerenin izolasyonunun bozulmaması gerekir, çünkü hava basıncı değişiklikleri uygulama sonuçlarını etkileyebilir (2) (Şekil 2).

CAM uygulamalarının avantajları

Bu modelde çalışmanın en temel avantajları arasında, çalışma yapılacak döllenmiş yumurtaların temininin ucuz ve kolay oluşu gelmektedir. Ayrıca, bu model üzerinde yapılacak çalışmaların hayvan etik kurul onayı gerektirmemesi bir diğer avantajdır.

Bu modelle yapılan çalışmalarda sonuçlara çok kısa sürede ulaşmak mümkündür. Çalışma sonuçları gözle rahatlıkla saptanabildiği gibi, uygun şartlarda fikse edilen preparatlarda ışık mikroskobundan elektron mikroskobuna kadar değişik duyarlılıkta histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılabilir. Ayrıca fikse edilmeyen örneklerde, DNA ve kollajen ölçülmesi mümkün olduğu gibi, istenirse gen ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışılabilir (Tablo I).

Bu modelin temel tıp branşları dışında, göz branşı tarafından da (a) yeni cerrahi aletlerin ve tekniklerin uygulanmasında, (b) damar kanül ve enjeksiyon tek-

niklerinin araştırılmasında, (c) anjiyografik çalışmalarda, (d) endoskopik cerrahi uygulamalarda da rahatlıkla kullanılan bir model olması ayrı bir önem taşır (7).

Anjiyogenez konusunda *in vivo* model olarak birçok yaklaşım mevcuttur. Bunlar içinde CAM modelinin temini, ucuzluğu, çalışma sonuçlarını değerlendirme kolaylığı yanında, güvenilir ve tekrarlanabilir olması önem arz etmektedir. Ülkemizin araştırma olanakları da göz önüne alındığında, civciv CAM modelinin anjiyogenez çalışmalarında en uygun model olduğu değerlendirilmektedir. Bu modeli kullanarak yaptığımız bazı çalışmaların sonuçları bildiri olarak sunulmuştur (11-14).

Kaynaklar

1. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004; 112: 402-412.
2. Norrby K. In-vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 588-612.
3. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2002; 35: 227-231.
4. Vallee BL, Riordan JF, Lobb RR, et al. Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia* 1985; 41: 1-15.
5. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assays for angiogenesis: a review. *Pharmac Ther* 1991; 51: 1-11.
6. Auerbach R, Lewis R, Shinnors B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003; 49: 32-40.
7. Leng T, Miller JM, Bilbao V, Palanker DV, Huie P, Blumenkranz MS. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina* 2004; 24: 427-434.
8. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncall L, Burri PH, Djonov V. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *Anat Rec* 2001; 264: 317-324.
9. Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P. Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by Ctochalasin D and Suramin. *J Exp Zool* 2002; 292: 241-254.
10. Hazel SJ. A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 217-228.
11. Özgürtaş T, Tapan S, Akgül EÖ, Erbil MK. Angiogenezde kullanılan bir *in-vivo* model: civciv koryoallantoik membran (CAM). VII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, 19-22 Nisan 2007, Antalya. Kongre Özet Kitabı, P61.
12. Özgürtaş T, Avcı Ö, Erbil MK. Bilberry inhibits angiogenesis in chick chorioallantoic membrane. 8th World Congress for Microcirculation, 15-19 August 2007, Milwaukee, USA. Kongre Özet Kitabı, 448.
13. Özgürtaş T. A novel approach at chick chorioallantoic membrane (CAM) model in angiogenesis. BIT 1st Annual World Cancer Congress, 14-19 October 2007, Beijing, China. Kongre Özet Kitabı, 119.
14. Durukan H, Özgürtaş T, Erbil MK, Mumcuoğlu T, Karagöz S. Bevacizumab ve pegaptanip sodyumun civciv koryoallantoik membran üzerine etkisi. Türk Oftalmoloji Derneği 41. Ulusal Kongresi, 30 Ekim-2 Kasım 2007, Antalya. Kongre Özet Kitabı, 277.

Tablo I. CAM modeliyle çalışmanın avantajları ve dezavantajları (2)

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