

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**PREMATÜRE RETİNOPATİSİ GELİŞEN  
BEBEKLERDE HASTALIK ŞİDDETİNİN VE  
TEDAVİ GEREKSİNİMİNİN ÖNGÜRÜLMESİNDE  
VEGF, VEGFR VE HGF-cMet GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

**DR. MAHMUT KAYA**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR- 2009**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
GÖZ HASTALIKLARI  
ANABİLİM DALI

**PREMATÜRE RETİNOPATİSİ GELİŞEN  
BEBEKLERDE HASTALIK ŞİDDETİNİN VE  
TEDAVİ GEREKSİNİMİNİN ÖNGÜRÜLMESİNDE  
VEGF, VEGFR VE HGF-cMet GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. MAHMUT KAYA**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF.DR. A.TÜLİN BERK**

**İZMİR – 2009**

**Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından 07.KB.SAG.048 sayı ile  
desteklenmiştir.**

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>RESİM LİSTESİ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLO LİSTESİ.....</b>	<b>v</b>
<b>ÖNSÖZ.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>1</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....</b>	<b>2</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>	<b>3</b>
<b>GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
<b>Epidemiyoloji.....</b>	<b>5</b>
<b>Patogenez.....</b>	<b>5</b>
<b>Prematüre Retinopati Sınıflaması.....</b>	<b>8</b>
<b>Prematüre Retinopati Taraması.....</b>	<b>14</b>
<b>Risk Faktörleri.....</b>	<b>16</b>
<b>MATERYAL-METOD.....</b>	<b>26</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>37</b>
<b>TARTISMA.....</b>	<b>57</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>ÇALIŞMAYA ALINAN HASTA LİSTESİ.....</b>	<b>80</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>84</b>

## **KISALTMALAR**

**ROP:** Prematüre Retinopatisi

**RDS:** Respiratuar Distres Sendromu

**gr:** gram

**CRYO-ROP:** KRIYO-ROP Çalışma Grubu

**ETROP:** Prematüre Retinopatisinin Erken Tedavisi

**ICROP:** Uluslararası Prematüre Retinopati Sınıflaması

**VEGF:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

**VEGFR:** Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

**sVEGFR:** Plazmada çözünen Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

**PIGF:** Plasental Büyüme Faktörü

**IGF-I:** İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü

**İVH:** İntraventriküler Kanama

**SNP:** Tek nükleotid polimorfizm

**HGF:** Hepatosit Büyüme Faktörü

**c-Met (HGFR):** Hepatosit Büyüme Faktörü Reseptörü

**µm:** Mikrometre

**dH<sub>2</sub>O:** Distile su

**ND:** Norrie hastalığı

**FEVR:** X-bağlı Ailevi Eksüdatif Vitreoretinopati

**PBMCs:** Periferal Mononükleer Kan Hücreleri

**HIF-1:** Transkripsiyon Faktör-1

## RESİM LİSTESİ

<b>Resim 1.</b> Demarkasyon hattı.....	9
<b>Resim 2.</b> Evre 2 ROP (Ridge).....	10
<b>Resim 3.</b> Evre 3 ROP (Fibrovasküler proliferasyon) + Plus (+).....	10
<b>Resim 4.</b> Evre 4 ROP (Parsiyel Retina Dekolmanı).....	11
<b>Resim 5.</b> Evre 5 ROP (Funnel Retina).....	11
<b>Resim 6.</b> Görüldüğü gibi 119, 126, 127, 128, 131 ve 133 numaralı hastalarda kesim sonucunda iki bant oluşmuştur, bu görünüm yabancı genotipi göstermektedir. 120, 122, 123, 124, 125, 130 ve 134 numaralı hasta örneklerinde ise hem kesilmiş hem de kesilmemiş olmak üzere üç bant görülmektedir, bu örneklerde heterozigot polimorfizm taşıyıcısı olduğunu göstermektedir. 121, 129 ve 132 numaralı örneklerde ise kesim olmamıştır, tek bir bant içeriyor, bu örnekler ise homozigot polimorfizm taşıyıcılığını göstermektedir.....	40

## SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Retinanın anatomik olarak sınıflandırılması.....	12
Şekil 2. VEGF ailesi, bağlandıkları reseptörler ve etkileri .....	21
Şekil 3. VEGF geni exon, intron ve izoformları.....	22
Şekil 4. HGF/c-Met ileti yolağı ve fonksiyonları.....	25
Şekil 5. Prematüre bebeklerin dağılımı.....	37
Şekil 6. Grupların cinsiyet dağılımı.....	38
Şekil 7. Gruplardaki VEGF-634 polimorfizm varlığı.....	42
Şekil 8. 15 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 polimorfizm noktasında T/T yabancı genotipi.....	44
Şekil 9. 19 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 heterozigot T/C genotipi.....	44
Şekil 10. 24 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 homozigot C/C genotipi.....	45
Şekil 11. Gruplardaki VEGF-460 polimorfizm varlığı.....	45
Şekil 12. 23 Nolu DNA örneğinde, polimorfizm noktasında VEGFR +32 yabancı G/G genotipi.....	48
Şekil 13. 56 Nolu DNA örneğinde, VEGFR +32 heterozigot G/A genotipi.....	48
Şekil 14. 13 Nolu VEGFR +32 DNA örneğine ait homozigot A/A genotipi.....	49
Şekil 15. Gruplardaki VEGFR+32 polimorfizm varlığı.....	49
Şekil 16. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGF-634 polimorfizm varlığı.....	52
Şekil 17. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGF-460 polimorfizm varlığı.....	54
Şekil 18. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGFR+32 polimorfizm varlığı.....	56

## **TABLO LİSTESİ**

<b>Tablo 1.</b> ETROP Sınıflandırılması.....	14
<b>Tablo 2.</b> Doğumdaki gestasyonel yaşına göre önerilen ilk göz muayenesi zamanı.....	15
<b>Tablo 3.</b> VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri.....	23
<b>Tablo 4.</b> Tasarlanan primer dizileri ve beklenen ürün uzunlukları.....	31
<b>Tablo 5.</b> Her bir primer çifti için optimum olduğu belirlenen PCR koşulları.....	32
<b>Tablo 6.</b> Prematüre bebeklerin dağılımı ve demografik özellikleri .....	39
<b>Tablo 7.</b> Üç grubun VEGF-634 G > C genotip dağılımı ve alel sıklığı. ....	41
<b>Tablo 8.</b> Üç grubun VEGF-460 T > C genotip dağılımı ve alel sıklığı.....	43
<b>Tablo 9.</b> Üç grubun VEGFR+32 G > A genotip dağılımı ve alel sıklığı .....	47
<b>Tablo 10.</b> ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGF-634 G > C genotip dağılımı ve alel sıklığı ....	51
<b>Tablo 11.</b> ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGF-460 T > C genotip dağılımı ve alel sıklığı.....	53
<b>Tablo 12.</b> ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGFR+32 G > A genotip dağılımı ve alel sıklığı...	55

## ÖNSÖZ

Daima yeniliklere ve tartışmaya açık kişiliği ile tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde, ihtiyaç duyduğum her anda, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana yol göstermiş olan tez danışman hocam, Sayın Prof. Dr. A. Tülin Berk'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her anda bana yardımcı olan, yol gösteren ve ufkumu açan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı başkanı Sayın Neşe Atabey ve çalışma arkadaşım Araştırma Görevlisi Murat Çokaklı'ya teşekkür ederim.

Tez süresince yardımlarını esirgemeyen Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalından Sayın Uzman Dr. Didem Yeşilirmak ve Araştırma Görevlilerine teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel analizlerinde bana yardımcı olan, DEÜTF Halk Sağlığı Ana Bilim Dalından Sayın Doç. Dr. Belgin Ünal'a teşekkürlerimi sunarım.

Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince daima beni destekleyen, bilimsel ve cerrahi eğitimimde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. A. Osman Saatci olmak üzere tüm hocalarıma ve uzmanlarıma teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimimi aldığım süre içinde birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan doktor arkadaşlarıma, klinik hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Yaşamımın her aşamasında bana destek olup sevgi ve ilgilerini hiçbir zaman eksik etmeyen, bugünlere ulaşmamda büyük emek ve desteği olan, doğru bildiğim yoldan kararlıca gitmemi öğütleyen annem ve babama saygı, sevgi ve minnet duygularımı sunarım.

Tanıdığım günden beri ihtiyaç duyduğum her anımda yanımda olan ve bana desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Dr. Derya Kaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Mahmut Kaya

15.10.2009

İzmir



## ÖZET

**Amaç:** Prematüre retinopatisi (ROP) gelişen bebeklerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve HGF reseptörü (cMet) gen polimorfizmlerinin araştırılması ve bu polimorfizmlerin hastalık gelişimi, hastalıkta kendiliğinden gerileme ya da eşik hastalığa ilerleme üzerindeki etkisini araştırmak.

**Materyal ve Metod:** Aralık 2006- Şubat 2009 tarihleri arasında prospektif olarak, gestasyonel doğum haftası  $\leq 34$  hafta olan 123 prematüre bebek çalışmaya alındı. Her bir preterm bebekten periferik kan örnekleri toplandı ve DNA izolasyonu yapıldı. Çalışılacak genlere ait promotor bölgeler kullanılarak primer tasarım işlemi yapıldıktan sonra, ilgili gen bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Preterm bebeklerde VEGF G<sup>-634</sup>C (+405) gen polimorfizmi restriksiyon enzimi ile kesilerek araştırıldı. VEGF T<sup>-460</sup>C, VEGFR-2 (Flk-1), HGF ve cMet genlerinin promotor bölgelerindeki polimorfizm varlığı sekanslama yöntemi ile tarandı. 123 bebek; tedavi gerektiren ROP (Grup 1), kendiliğinden gerileyen ROP (Grup 2) ve ROP gelişmeyen bebekler (Grup 3) olarak sınıflandırıldı.

**Bulgular:** VEGF G<sup>-634</sup>C (+405) polimorfizm varlığı sırasıyla Grup 1 bebeklerin %40.5, Grup 2 bebeklerin %42.0 ve Grup 3 bebeklerin %35.5'inde saptandı. VEGF T<sup>-460</sup>C polimorfizmi sırasıyla Grup 1'de %59.5, Grup 2'de %58 ve Grup 3 bebeklerde %64.5 saptandı. Flk-1 G<sup>+32</sup>A polimorfizm varlığı ise sırasıyla Grup 1'de %33.3, Grup 2'de %26 ve Grup 3'te %19.4 saptandı. Sonuçlarımız, preterm bebeklerde ROP gelişimi, hastalıkta kendiliğinden gerileme ya da eşik hastalığa ilerleme ile VEGF G<sup>-634</sup>C (+405), VEGF T<sup>-460</sup>C ve VEGFR-2 (Flk-1) G<sup>+32</sup>A genlerinin promotor bölgelerindeki polimorfizm sıklığı arasındaki ilişki üç grup arasında da benzer bulundu (sırasıyla  $p=0.840$ ,  $p=0.840$  ve  $p=0.406$ ). VEGF G<sup>-634</sup>C (+405), VEGF T<sup>-460</sup>C ve VEGFR-2 G<sup>+32</sup>A polimorfik alel taşıyıcılığı açısından da gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. HGF ve cMet genlerinin promotor bölgesinde herhangi bir polimorfizm saptanmadı.

**Sonuç:** Çalışmamızda, ROP gelişimi ve progresyonu ile VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met promotor gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin zayıf olduğu gösterildi. Çalışmamızın, ROP ile ilişkili genetik faktörlerin, hastalık şiddeti ve tedavi gereksiniminin öngörülmesinde aday genlerin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** c-Met, genetik polimorfizm, HGF, prematüre retinopatisi, VEGF, VEGFR

## SUMMARY

**Purpose:** The aim of this study was to determine whether there are vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor (VEGFR-2), hepatocyte growth factor (HGF), HGF-receptor (c-Met) gene polymorphisms in ROP, and to observe the effects of these polymorphisms on the development of ROP, spontaneous regression or progression to threshold disease.

**Methods:** A sample of 123 preterm infants with gestational age  $\leq 34$  weeks were prospectively evaluated between December 2006 and February 2009. For genetic analysis, blood samples were collected from each patient and leukocyte DNA was isolated. Genomic DNA was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) method with two pairs of primers designed to amplify separately the promoter regions of the VEGF, VEGFR, HGF and c-Met genes. The amplified product was subjected to restriction enzyme digestion or direct sequencing. The infants were divided into 3 groups; ROP requiring treatment (Group 1), spontaneously regressing ROP (Group 2) and no ROP (Group 3).

**Results:** The frequency of VEGF-634G>C polymorphism was 40.5% in group 1, 42% in group 2 and 35.3% in group 3. The frequency of VEGF-460 C>T polymorphism was 59.5% in group 1, 58% in group 2 and 64.5% in group 3. The VEGFR+32G>A (Flk-1+32G>A) polymorphism was identified in 33.3% of infants in group 1, 26% of infants in group 2 and 19.4% of infants in group 3. Our results were similar in all studied groups regarding the association of frequencies of the VEGF-634G>C, VEGF -460 C>T and VEGFR-2 gene promoter polymorphism and the development of ROP, spontaneous regression of ROP and progression to threshold ROP ( $p:0.840$ ,  $p:0.840$  ve  $p:0.406$ , respectively). The carriage of polymorphic allele of VEGF-634G>C, VEGF -460 C>T and Flk-1 +32G>A were not significantly different between the studied groups. HGF and cMet gene promoter polymorphisms did not exist in any of the groups.

**Conclusion:** In our study, the association of the VEGF, VEGFR, HGF and c-Met gene promoter polymorphisms with the risk of development and progression of ROP is weak. We believe that, our study will contribute to reveal the probable genes in the process of predicting the genetic factors related to ROP, the severity of the disease and the need treatment.

**Key Words:** c-Met, genetic polymorphism, HGF, retinopathy of prematurity, VEGF, VEGFR

## GİRİŞ VE AMAÇLAR

Prematüre retinopatisi (ROP), çocukluk çağı körlük nedenlerinin başında gelmektedir. Ancak en önemli özelliği uygun ve zamanında gerçekleştirilen tarama ve tedavi programları ile önlenabilir ve tedavi edilebilir olmasıdır (1-3). Son yarım yüzyılda tıbbi ve teknolojik alanlardaki gelişmeler yenidoğan yoğunbakım ünitelerinin bakım kalitelerini artırmış ve yaşanabilirlik sınırlarının tartışıldığı pek çok prematüre bebek yaşatılmaya başlanmıştır. Buna karşın, tüm gebeliklerin % 7-11'i olarak bildirilen prematüre doğum oranlarında kayda değer bir azalma görülmemiştir. Hatta yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmeler nedeniyle çoğul gebelikler ve prematüre bebeklerin doğumu daha da artmıştır (4,5). Gelişmiş ülkelerde ise son on yılda ROP sıklığı azalma göstermiştir ve bu ülkelerde neredeyse sadece doğum ağırlığı 1000 gr'ın altında olan çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin problemi olarak karşımıza çıkmaktadır (6-8).

İlk kez 1942'de Theodore Terry (9) tarafından damarların ve fibroblastik dokunun lensin arkasında gelişmesi ve erken doğan bebeklerde iki taraflı körlük yapması şeklinde tanımlanan ROP, 10 yıl içerisinde çocukluk çağı körlüklerinin en sık nedenleri arasında yerini almıştır. Yenidoğanlarda kontrolsüz oksijen desteğinin olumsuz retinal yan etkileri, ilk olarak Campbell (10) tarafından 1951 yılında öne sürülmüş ve ilk ROP epidemisi oksijen kullanımının kontrol altına alınması sonucu önlenmiş ve sonlandırılmıştır. Fakat oksijen kullanımının kesilmesine bağlı olarak yenidoğanlarda atelektazi ve respiratuar distres sendromdan (RDS) ölümler artış göstermiştir.

1970 ile 1980 yılları arasında ikinci ROP epidemisi görülmüştür. Bu epidemide dikkatli monitarizasyonlu ventilasyon yöntemlerinin geliştirildiği ve 750-999 gr gibi çok düşük doğum ağırlığındaki preterm bebeklerin yaşam oranlarının arttığı görülmüştür (11). Üçüncü ROP epidemisi ise geçtiğimiz 10 yılda özellikle Latin Amerika, Doğu Avrupa ve Asya ülkeleri gibi orta düzeyde gelirlili ülkelerde yaşanmıştır. Bu epideminin muhtemel nedenleri; yetersiz doğum öncesi izlem oranlarının prematüre doğum oranlarında artışa yol açması ve temel yenidoğan bakım koşullarının düşük doğum ağırlıklı (<1500 gr) bebeklerin yaşatılabilmesini sağlayacak düzeyde olması ve fakat morbiditeleri önleyecek kalitede bulunmamasıdır (12,13).

## **AMAÇLAR:**

1. Gebelik yaşı  $\leq 34$  hafta olan prematüre bebeklerde VEGF, VEGFR ve HGF- cMet gen polimorfizmlerin varlığını saptamak
2. Tedavi gerektiren ROP, kendiliğinden gerileyen ROP ve normal (ROP gelişmeyen) prematüre bebeklerde VEGF, VEGFR ve HGF- cMet gen polimorfizmlerini karşılaştırmak.
3. Bu polimorfizmlerin hastalık gelişimi, hastalıkta gerileme ya da eşik hastalığa ilerleme açısından önemini vurgulamak
4. Polimorfizm saptanan bebeklerde, hastalığa yatkınlığın belirlenmesinin yanı sıra, tedavi yanıtı ve tedavi ihtiyacının ( indirekt lazer uygulaması  $\pm$  anti- VEGF ajan uygulaması) önceden belirlenerek risk altındaki hastaların erken dönem tanı ve tedavisinde kullanılabilirliğini belirlemektir.

## **GENEL BİLGİLER**

### **EPİDEMİYOLOJİ**

ROP'un insidansı, klinik seyri ve doğal sürecine ilişkin yararlı bilgiler CRYO-ROP (Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity; CRYO-ROP) çalışmasından elde edilmiştir. 1986 yılında başlatılan bu prospektif, randomize, çok merkezli çalışmada (CRYO-ROP) doğum ağırlığı 1251 gramdan (gr) küçük 4099 yenidoğan incelenmiş ve bir veya iki gözde herhangi bir evredeki ROP sıklığı % 65.8 olarak bildirilmiştir (14). Cinsiyet, eşik hastalığa ilerlemeyle ilişkili bulunmazken, çoklu doğum ve hastane dışı doğum, ağır hastalık gelişmesi riskini arttırmaktaydı.

Yakın geçmişte yapılan çok merkezli prematüre retinopatisinin erken tedavisi "Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP)" çalışmasında, doğum ağırlığı 750 gr'ın altında olan yenidoğanların %92.7'sinde, doğum ağırlığı 750-999 gr olanların %75.8'inde ve doğum ağırlığı 1000-1250 gr olan yenidoğanların ise %43.7'sinde ROP geliştiği bildirilmiştir (15,16). Doğum ağırlığı 1251 gr'dan az olan tüm yenidoğanlar için ROP sıklığı %68 olarak ifade edilmiştir. Gebelik yaşı 27 hafta ve altında olan yenidoğanların %89'unda ROP saptanırken, 28-31 hafta gebelik yaşı olanlarda %51.7, gebelik yaşı 32 hafta ve üzerinde olan yenidoğanlarda ise %14.2 oranında ROP bildirilmiştir. CRYO-ROP ve ETROP çalışmalarının her ikisinde de ROP sıklığı benzer bulunmuş olup, gebelik yaşı ve doğum ağırlığı azaldıkça ROP sıklığı artmaktadır.

Bazı yeni çalışmalarda (17,18) CRYO-ROP ve ETROP çalışmalarına (14-16) göre daha düşük oranlarda ROP sıklığı bildirilirken, yapılan bir çalışmada (19) ise daha yüksek sıklıkta ROP geliştiği bildirilmiştir. Çalışmalardaki düşük sıklık değerleri çalışmaya alınan yenidoğan sayısının yetersiz veya az olmasına bağlı olabilirken, sıklığındaki artış modern yenidoğan yöntemlerindeki ilerlemelere bağlı olarak ileri derecede immatür yenidoğanların sağ kalım oranlarının artması sonucu olabileceği vurgulanmaktadır.

### **PATOGENEZ**

Göz iki vasküler sistemden oksijen ve besin maddelerini sağlar. Retinal damarlar retinanın iç kısmını ve koroid damarları ise fotoreseptörleri içeren dış tabakaları destekler (20). Koroidin gelişimi gestasyonun üçüncü ayında tamamlanır. Fakat retina damarlanması doğumdan birkaç hafta sonrasına kadar sürebilir (21). İnsan fetusunda, retina kan damar gelişimi gestasyonun 16.

haftasında başlar ve nazal retinada 36., temporal retinada ise 40.-42. gestasyonel haftalarda tamamlanır. Bu yüzden prematüre olarak doğan bebeklerin retina damarları tam olarak gelişmemiştir ve gestasyonel yaşa bağlı olarak periferde avasküler alan mevcuttur (22).

Retina kan akımı, koroid kan akımına göre nispeten daha düşüktür. Retinanın oksijenlenmesinde ve diğer beslenme ihtiyaçlarında koroid önemlidir (23). Yetişkinlerde, retina kan akımı ve koroid kan akımının perfüzyon basıncı geniş bir aralıkta sabit tutulmaya çalışılır. Preterm yenidoğanlarda ise retina kan akımı ve koroid kan akımı otoregülasyonu hemen hemen yoktur. Hem yetişkin hem de yenidoğanlarda retina kan akımı otoregülasyonu oksijen basıncındaki değişikliklere cevap verir. Fakat, preterm bebeklerde koroid dolaşımı değişen oksijen basıncı cevabında otoregülasyon yapmakta yetersizdir (24).

VEGF, embriyogenez sırasındaki normal anjiyogenezde ve doğum sonrasında patolojik koşullarda retinanın anormal neovaskülarizasyonunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. VEGF geni oksijen basıncına duyarlıdır; hipoksi durumunda VEGF transkripsiyonu uyarılırken, hiperoksi durumunda ise genellikle VEGF transkripsiyonu azalmaktadır (25). Retinanın gelişimi metabolik ihtiyaçta artışa neden olur ve gelişmekte olan retina damarlarının önünde lokal rölatif (fizyolojik) bir hipoksi oluşur (26). Oksijen bağımlı VEGF, vasküler gelişimin bütün evrelerinde rol oynar ve oksijen bağımsız insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi diğer bazı büyüme faktörleriyle bir arada etkili olur. VEGF, olgunlaşan avasküler retinada fizyolojik hipoksik dalgalara yanıt olarak astrositlerden ve mezenkimal işsi hücrelerden salınır (27,28).

İntrauterin yaşamda fetusun arteriyel oksijen basıncı 30-35 mmHg olup, bebek doğar doğmaz oda koşullarında aldığı soluklarla bu değer 60-100 mmHg'ya yükselir. Prematüre doğan bebeklerde buna ek olarak RDS ve diğer solunum problemleri nedeniyle uygulanan solunum destek tedavilerinin oluşturduğu hiperoksi, prematüre retina damarlarında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını baskılar ve retina damarlanması durur (25). Hipoksi ve hiperoksi tarafından uyarılan büyüme faktörü ya da faktör düzenleyicileri ROP gelişiminde önemlidir. Hipoksi ile artan VEGF- mRNA tümör ve retinal anjiyogenezde anahtar rol oynar. ROP, damarların kaybolduğu başlangıç evresi ve takiben damarların proliferere olduğu ikinci evreden oluşan bifazik bir hastalıktır. ROP'un başlangıç evresi "**Faz I: Hiperoksik Faz**" olarak tanımlanmaktadır. Bu fazda normal retinal vaskülarizasyon için gerekli olan VEGF salınımı hiperoksi tarafından baskılanır. Normal vasküler büyümenin durması ve takiben mevcut

damarların regresyonu meydana gelir. Hiperoksi-bağımlı vazo-obliterasyon vasküler endotelial hücrelerin apoptozisine neden olur. ROP'un ikinci fazı hipoksi tarafından sürdürülür. Oksijenin neden olduğu şiddetli damar spazmı ve sonuç olarak hipoksiyi takiben retinada VEGF salınımı artar. Tekrarlayan apneler, bronkopulmoner displazi, anemi gibi hipoksiye yol açan çeşitli faktörlerin varlığında retinanın metabolik aktivitesinin artışı, VEGF salınımını daha da artırır. VEGF'deki bu artış retinada nadiren normal, sıklıkla anormal yeni damarlanmanın başlamasına yol açar. Damarlanma normal olursa ROP geriler. Anormal damarlanma sonucu ilerleyici retinopati meydana gelir. VEGF artışıyla yeniden damarlanmanın olduğu bu evre **“Faz II: Hipoksik Faz”** olarak tanımlanmaktadır. ROP'un ilk fazı dışardan VEGF ya da Plasental büyüme faktörü (PlGF-1), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1) spesifik ligandın uygulamasıyla kısmen önlenir. ROP'un ikinci fazında VEGF inhibitörlerinin intravitreal enjeksiyonlarını takiben neovaskülarizasyonda önemli derecede azalma görülür. Klinik araştırmalar, ROP'un proliferatif fazın tedavisini değerlendirmek için planlanmıştır. ROP'un ilk fazı yaklaşık olarak 30-32. haftadalar arasında meydana gelir. Hipoksi-bağımlı retinal neovaskülarizasyonla karakterize ROP'un ikinci fazı ise 32-34. haftalarda başlar. Hipoksi proliferatif retinopati için zorunlu bir uyarandır. VEGF, hipoksi bağımlı bir sitokin ve vasküler endotelial hücre mitojenidir. Günümüzde, ROP'un ilerleyici neovaskülarizasyonu hipoksik perifer retinaya lazer ablasyonu ile durdurulmaktadır. Hipoksinin ortadan kalkması ile VEGF salınımında azalma meydana gelmektedir (25-29).

Hayvan modellerinin kullanımı (fare, sıçan gibi) hastalığın ilerleme mekanizmasını daha iyi anlamamızı sağlamıştır. Çoğu hayvanın doğumunda retina vaskülarizasyonu tamamlanmamıştır. ROP'un hayvan modellerinde ilave oksijen verilmesi ile normal damarsal gelişimin engellendiği görülmüştür. Hayvan modellerinde hiperoksi kullanımı, VEGF azalmasına ikincil normal damar gelişimin kesilmesine neden olduğu gösterildi. Ayrıca, hiperoksi vasküler endotelial hücre apoptozisine ve vazo-obliterasyona neden olmuştur. Bu, VEGF'un immatür retina damarlanmasının devamı için gerekli olduğunu gösterir (25). VEGF inhibisyonu, ROP'un ikinci fazında hipoksinin neden olduğu retinal neovaskülarizasyonu tamamıyla inhibe etmemektedir (30). Bulgular ROP'un multifaktöriyel bir hastalık olduğunu desteklemektedir. Her ne kadar VEGF ve oksijen retina kan damarlarının gelişimi için önemli rol oynasa da, patogeneizde başka biyokimyasal mediatörlerin de bulunduğu açıktır. Bu mediatörlerin başında

insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gelmektedir. IGF-1 retina damarlarının normal gelişimi için önemlidir. Fare ROP modelinde IGF-1'in ROP'un her iki fazında kritik rol aldığı gösterilmiştir ve bu durum klinik sonuçlarla desteklenmiştir. IGF-1, gebeliğin tüm evrelerinde fetal büyüme ve gelişme için önemlidir. IGF-1'in serum konsantrasyonu gestasyonel yaş ve fetal büyüme ile orantılıdır. IGF-1 seviyeleri gebeliğin üçüncü trimestrinde önemli derecede artar fakat doğumdan sonra plasenta ve amniyotik sıvı tarafından üretilen IGF-1'in kaybı nedeniyle düşer. Doğumdan sonra IGF-1, çok düşük miktarlarda sadece karaciğer tarafından üretilir. IGF-1'in eksikliği, vasküler büyüme eksikliği ve sonuç olarak proliferatif ROP ile ilişkilidir. Faz 1 ROP'ta IGF-1'in rolü klinik çalışmalarla desteklenmiştir. Yaş- karşılaştırmalı prematüre bebeklerde IGF-1'in ortalama serum seviyeleri klinik ROP şiddeti ile direkt orantılı bulunmuştur. IGF-1 aynı zamanda VEGF'ün aktivasyonunun kontrol edilmesinde rol oynamaktadır. Oksijenden bağımsız IGF-1 ve oksijen bağımlı VEGF, birbirini tamamlayıcı ve sinerjistik etki göstermektedirler. IGF-1 hem VEGF aktivitesini artırarak hem de VEGF'den ve hipoksiden bağımsız olarak etki eden önemli bir faktördür (25-30).

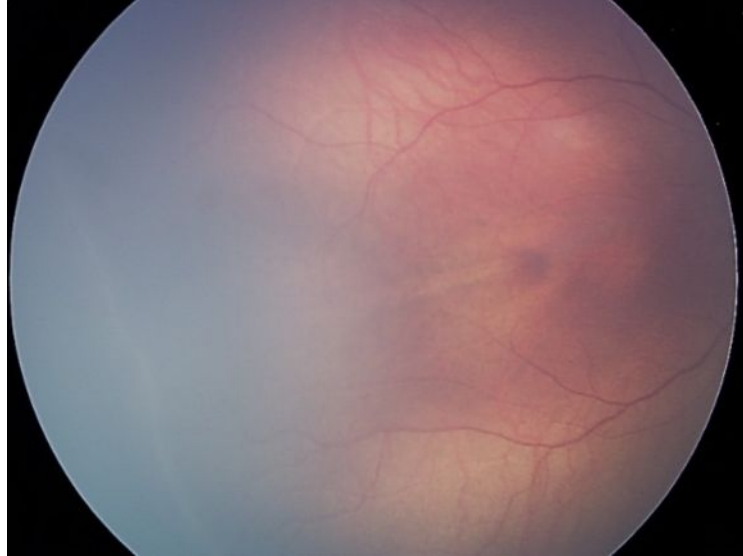
Birçok farklı büyüme hormonunun, retinal neovaskülarizasyon gelişiminde rol oynadığı gösterilmektedir. Bu büyüme faktörlerinden birisi de Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) dır (22). HGF, retinal anjiyogenezde önemli bir düzenleyicisi olarak ilgi çektiği kabul edilmektedir. HGF fibroblast, vasküler düz kas hücreleri ve glial hücreler gibi stromal kaynaklı hücrelerden salgılanmaktadır. HGF epitel hücrelerinde mitojenik, motojenik (hareketliliği sağlayan) ve morfojenik faktör olarak, epitel ve endotel hücrelerinde ise anjiyogenik faktör olarak biyolojik fonksiyon göstermektedir. Son yapılan çalışmalarda HGF uyarısının endotel hücrelerinde hem büyüme hem de migrasyon yaptığı in vitro olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda HGF'nin anjiyogenezde güçlü bir uyarıcı olduğu vurgulanmaktadır. HGF, ROP patogenezinde retinal anjiyogenezin başlangıç fazında önemli rol oynayabilir (22,25-30).

## **ROP SINIFLAMASI**

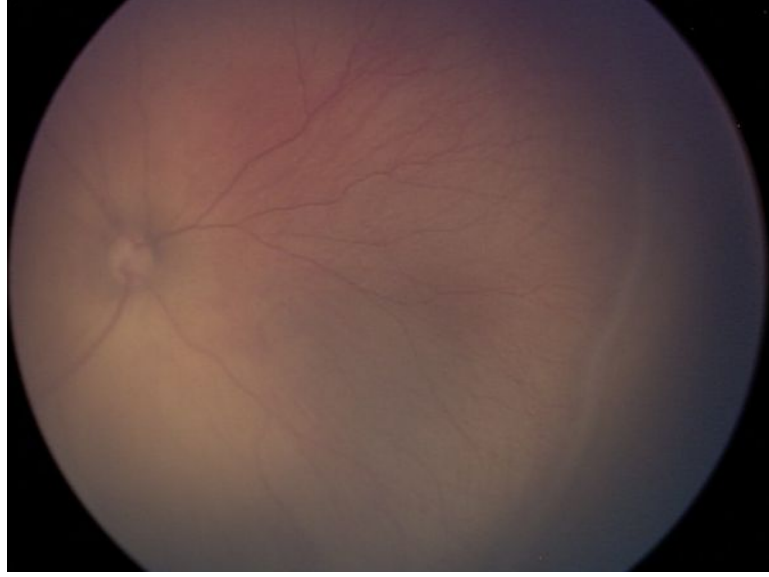
ROP ilk kez 1984 yılında uluslararası bir komite tarafından "The International Classification of Retinopathy of Prematurity -ICROP" adıyla sınıflandırılma yapılarak iki rapor şeklinde basılmıştır. Sınıflandırma, bu hastalıkla ilgili yaygın klinik deneyimi olan kişiler ve 1980 başlarında ICROP'ın asıl üyesi olan çoğu kişi tarafından altı ülkeden 15 oftalmolog'dan



oluşan bir grubun sonuçları ile gerçekleştirilmiştir. Uluslararası Prematüre Retinopati Sınıflaması ROP'un klinik değerlendirilmesinde, hastalığın anatomik yerleşimi (Zon) ve ağırlığı (Evre) temelinde standartlar sağlamak amacıyla 1987'de gözden geçirilmiştir (31-33). Bu sınıflamaya göre, ROP'un ilk bulgusu (Evre I-demarkasyon hattı) posteriodaki vasküler retina ile anteriodaki avasküler retina birleşiminde ince, düz ve beyaz bir yapının ortaya çıkmasıdır **(Resim 1)**. Evre II ROP, demarkasyon hattının pembe veya beyaz kalınlaşmış bir doku kabarıklığına dönüşmesiyle oluşur **(Resim 2)**. Kabarıklığın posteriorunda küçük damar demetleri (taft) görülebilir. Kabarıklık içi ve üzeri damar gelişimi - ekstraretinal fibrovasküler proliferasyon- evre III ROP olarak tanımlanır **(Resim 3)**. Fibrovasküler proliferasyon vitreus içine uzanabilir ve vitreus kanamasına yol açabilir. Bu fibrovasküler proliferasyonun, ilerleyici olarak vitreus içine büyümesiyle kontraksiyonu, retinaya traksiyon uygulayıp evre IV ROP dediğimiz parsiyel retina dekolmanına yol açar **(Resim 4)**. Evre IVa'da dekolman foveayı içermemektedir, evre IVb'de ise dekolman foveayı içine almaktadır. Evre V ROP, total retina dekolmanını ifade etmektedir **(Resim 5)**.



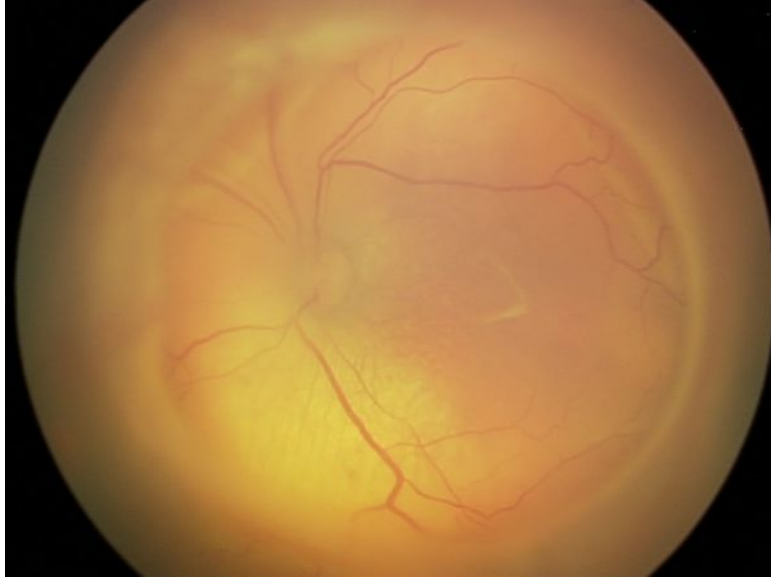
**Resim 1. Demarkasyon hattı (PEDOF Birimi arşivinden alınmıştır.)**



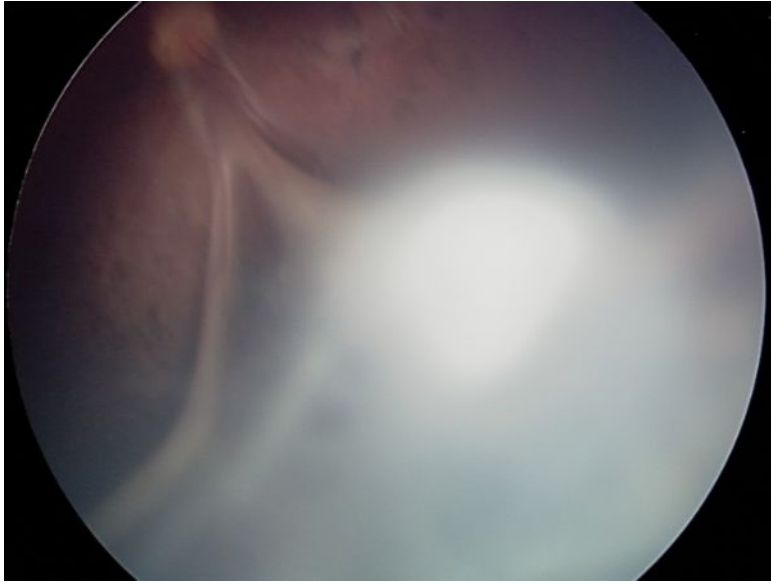
**Resim 2. Evre 2 ROP (Ridge) (PEDOF Birimi arşivinden alınmıştır.)**



**Resim 3. Evre 3 ROP (Fibrovasküler proliferasyon) + Plus (+)  
(PEDOF Birimi arşivinden alınmıştır.)**



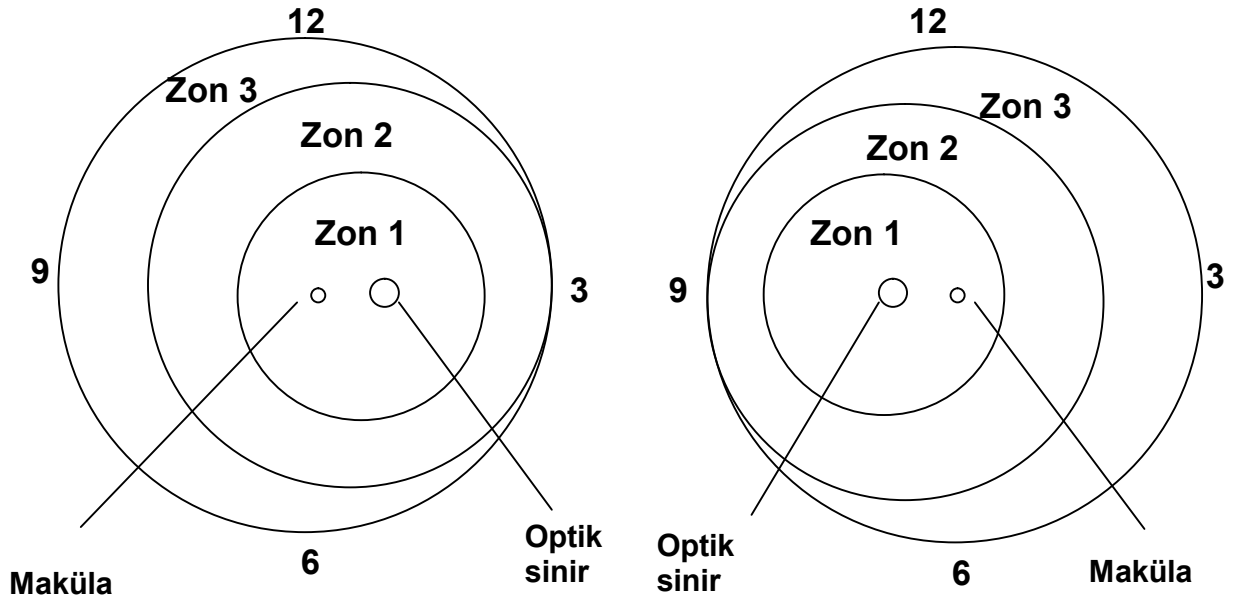
**Resim 4. Evre 4 ROP (Parsiyel Retina Dekolmanı)  
(PEDOF Birimi arşivinden alınmıştır.)**



**Resim 5. Evre 5 ROP (Funnel Retina)  
(PEDOF Birimi arşivinden alınmıştır.)**

ROP'un akut fazlarında, anormal gelişmekte olan damarların sınırındaki damar yetmezliği, periferik retina damarlarının genişlemesine ve kıvrımlanma (tortüozite) artışına, iris damarlarında dolgunlaşmaya, pupiller rijiditeye ve vitreus bulanıklaşmasına (haze) yol açar. Bu bulgular ICROP tarafından ilerleyici vasküler hastalık olarak tanımlanmıştır. “**Plus hastalık**”, kanın periferik vasküler şantının arka kutupta venöz genişleme ve arteriyel kıvrımlanma artışına yol açacak kadar şiddetli olması durumunda ortaya çıkar (**Resim 3**). Plus hastalık, hızlı ilerleyen ROP'un temel bulgusu olup, ROP evresini gösteren numaradan sonra artı işareti konulmasıyla tanımlanır (**Plus +**) (31-33).

ROP ayrıca, retina vaskülarizasyonunun anterior uzanımının yeri tespit edilerek anatomik yerleşimine göre sınıflandırılır (**Şekil 1**). Vasküler retina ile avasküler retina arasındaki sınırın bulunduğu yer , önemli bir prognostik bulgudur. Zon 1, merkezi optik disk, yarıçapı, diskle makula arası mesafenin iki katı olan hayali çember olarak tanımlanır. Zon 2, Zon 1'in ön sınırından başlayıp nazalde ora serrata, temporalde ise anatomik ekvatora uzanan alan olarak tanımlanır. Zon 3, kalan temporal retinayı içerir (31-33).



**Şekil 1. Retinanın anatomik sınıflaması**

1988 yılında, çok merkezli Prematüre Retinopatisinin kriyoterapisi çalışmasında (CRYO-ROP) çalışma grubu tarafından ROP'un görsel prognozunu düzeltmek amacıyla taramalar yapılmıştır (34). Bu taramaların amacı tedavi ihtiyacı olan ROP' lu bebekleri tespit etmek ve tedavi fırsat penceresini bu hastalara sunmaktır. Her ne kadar başlangıçta sadece klinik kanaate dayanıyordusa da "eşik hastalık" tedavinin uygulanması gereken nokta olarak kabul edilmiştir. Eşik hastalık, Zon 1 veya Zon 2'de, en az komşu 5 saat kadranını tutan veya ayrı ayrı 8 saat kadran retinayı tutan Evre III + ROP olarak tanımlanır. Zon 2 ROP için bu öngörü büyük bir yakınlıkla kanıtlanmıştır. Zira tedavi edilmemiş gözlerin % 62'si kötü görsel sonuçlanmaya gitmiştir. Buna karşın Zon 1 ROP' ta, tedavi edilmeyen gözlerin görsel prognozun yarısında kötü ve yarısında ise iyi olacağı varsayımı tutmamıştır, tedavi edilmeyen gözlerin % 90'ı kötü sonuçlanma şansına sahiptir (35,36).

CRYO-ROP çalışmasında, tedavi edilmiş Zon 1 gözlerin, 10 yıllık takiplerinde gözlerin % 44.4'ünde görme keskinliğinin 6/60 ya da daha kötü olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, tedavili Zon 2 gözlerle karşılaştırıldığında, tedavili Zon 1 gözlerde önemli derecede kötü yapısal değişiklikler ve görme sonuçları olduğu gözlenmiştir (37). Bu sonuçlar araştırmacılar arasında, özellikle Zon 1 hastalıkta, ROP tedavisi için eşik hastalık durumu beklenmeli mi? sorusuna neden olmuş ve ABD'de 26 merkezde ETROP çalışması başlatılmıştır. Yüksek riskli eşik hastalık öncesi (high-risk prethreshold disease) tedavinin eşik hastalık tedavisine göre daha yararlı olduğu gösterilmiştir (38). ETROP sınıflaması Tip 1 ve Tip 2 olarak sınıflandırılmıştır. Hastalık, Tip 1 kriterlerinden birini karşılıyorsa tedavi edilmelidir, Tip 2 kriterlerinden birini karşılıyorsa gözlenmeli ve hastalık Tip 1 ya da eşik hastalığa ilerliyorsa tedavi edilmelidir. ETROP sınıflamasına göre (**Tablo 1**); Tip 1 hastalıkta: Zon 1'de plus hastalıkla birlikte ROP'un herhangi bir evresinin olması, Zon 1'de plus hastalıklı ya da plus hastaliksız evre III ROP olması ya da zon 2'de plus hastalıkla birlikte evre II ya da evre III ROP olması olarak tanımlanır. Tip 2 hastalık: Zon 2'de plus hastalık olmadan evre I ya da evre II ROP varlığı, Zon 2'de plus hastalık olmadan evre III ROP varlığı olarak kabul edilir (39).

## **ETROP SINIFLAMASI**

### **Tip 1 ROP tedavi edilmeli**

- Zon 1 de plus hastalıkla birlikte ROP'un herhangi bir evresinin olması
- Zon 1 de plus hastalıklı ya da plus hastaliksız evre III ROP olması
- Zon 2 de plus hastalıkla birlikte evre II ya da evre III

### **Tip 2 gözlenmeli, hastalık Tip 1 ya da eşik hastalığa ilerliyorsa tedavi edilmeli**

- Zon 2 de plus hastalık olmadan evre I ya da evre II ROP varlığı
- Zon 2 de plus hastalık olmadan evre III ROP varlığı

**Tablo 1. ETROP Sınıflaması**

## **ROP TARAMASI**

Prematüre bebeklerde, düzeltilen yaşam koşulları ile birlikte ROP insidansında ve körlüklerde artışla karşılaşmıştır. Günümüzde tedavi, ROP'un gidişatını değiştirmede etkilidir ve körlükleri önleyebilir. Tedavi gerektiren bebekleri tespit etmek ve zamanını belirlemek amacıyla, riskli bebeklerin taranması ilk önemli basamaktır. Amerikan Oftalmoloji Akademisi, Amerikan Pediatri Akademisi ve Amerikan Pediatrik Oftalmoloji ve Şaşılık Birliği'nin (40) yayınladığı son bildiri de doğum ağırlığı 1500 gr'ın altında olan veya gestasyonel yaşı 30 hafta ya da < 30 haftanın altında olan tüm yenidoğanların ROP açısından taranması önerilmektedir. Doğum ağırlığı 1500 ve 2000 gr arasında olan ya da gestasyonel yaşı 30 haftadan daha büyük olup klinik durumu stabil olmayan, solunum ya da dolaşım desteğine ihtiyaç duyan ve izleyen yenidoğan uzmanı/pediatri uzmanı tarafından yüksek riskli olduğu değerlendirilen bebeklerde de ROP taraması önerilmektedir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki tarama rehberleri farklılık

gösterebilmektedir (12,41). ROP taramasında, şiddetli hastalık tanınması çok önemli olduğundan deneyimli ve becerikli kişilerce değerlendirilmelidir. ROP'un %99 güvenle tespit edilebilmesini sağlayacak ve travmatik muayene sayısını en aza indirecek gestasyonel yaşına göre en uygun ilk tarama muayenesi zamanı tabloda özetlenmiştir [(40), (Tablo 2)].

Doğumda gestasyonel yaş (hafta)	İlk muayene zamanı (hafta)	
	Postmenstrüel	Kronolojik
22	31	9
23	31	8
24	31	7
25	31	6
26	31	5
27	31	4
28	32	4
29	33	4
30	34	4
31	35	4
32	36	4

**Tablo 2. Doğumdaki gestasyonel yaşına göre önerilen ilk göz muayenesi zamanı**

İlk muayeneden sonraki muayene sıklığına, izleyen oftalmolog tarafından retina bulgularına göre karar verilir (40).

## **RİSK FAKTÖRLERİ**

### *1. Gestasyonel Yaş ve Düşük Doğum Ağırlığı*

Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı küçüldükçe ROP gelişme riski artmaktadır. CRYO-ROP çalışmasında, eşik ROP gelişimi için bağımsız risk faktörleri; beyaz ırk, düşük doğum ağırlığı, gebelik yaşının küçük olması, çoğul gebelik ve araştırma merkezi dışında doğmuş olmak olarak belirlenmiştir (42,43). CRYO-ROP grubu çalışmasının verilerine göre, 1000-1250 gr arasında olan bebeklerin %47'sinde, 750 gr dan küçük olan bebeklerin %90'ında çeşitli derecelerde ROP saptanmıştır. Evre III ROP, 1000-1250 gr arasında olanların %8'inde, <750 gr olanların ise %37'sinde saptanmıştır. Benzer durum doğumdaki gestasyonel yaş için de geçerlidir ve 28 haftadan erken doğan bebeklerin %83'ünde, <31 hafta olanlarda ise %30 ROP saptanmıştır (34). Yaman ve ark.'larının (44) yaptıkları çalışmada 1250 gr'ın altındaki bebeklerde eşik hastalık %13.6 oranında görülürken, 1251-1500 arasındaki bebeklerde %8.3 oranında görülmüştür. Doğum ağırlığı 1501 gr'ın üstündeki hiçbir bebekte eşik hastalığın görülmediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, gestasyonel yaşlarına göre 28 hafta ve altındaki bebeklerde eşik hastalık gelişimi %25 iken, 29 hafta ve üstünde %1.3 olarak gözlenmiştir. Aroe ve ark.'ları (45) yaptıkları çalışmada ROP insidansı %11-60 olarak bulunmuş ve <28 haftalık bebeklerde %60, <30 haftalık %41 oranında bildirilmiştir. Günümüzde ROP, çok düşük gebelik haftalarında (24-27 hafta) ve ileri derece düşük doğum ağırlığı (<1000) olan yenidoğanlarda daha sık ve daha şiddetli olarak karşımıza çıkmaktadır (46). Ancak gelişmiş ülkelerle karşılaştırıldığında gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde, daha matür yenidoğanlarda tedavi gerektiren şiddetli ROP meydana geldiği de unutulmamalıdır. Bu da ROP gelişiminde doğum ağırlığı ve gestasyonel yaş haricinde, çevresel ve genetik faktörlerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

### *2. Oksijen Etkisi*

ROP gelişiminde risk faktörleri arasında bulunan ve patogenezin de temelinde yatan oksijen yoğunluğu yer almaktadır. Ek oksijen uygulama süresi, tekrarlayan oksijen değişimleri ve oksijen konsantrasyonunun, gestasyonel yaş ve doğum ağırlığından bağımsız olarak ROP gelişiminde etkili faktör olduğu ileri sürülmektedir (47,48). Daha kısa süreli ve daha düşük konsantrasyonlarda oksijen uygulaması yüksek riskli hasta gruplarında ROP sıklığında belirgin



azalmaya neden olmaktadır (49). Arteriyel oksijen düzeyindeki dalgalanmalar, günümüzde ROP gelişiminde kabul gören en yaygın teoridir. Hiperoksi ve hipoksi arasında değişkenlik gösteren, tekrarlayan oksijen değişiklikleri, retinada vaskularizasyon anomalilerine yol açar. Hiperoksi retina damarlarında vazokonstriksiyona yol açarak 48-72 saat içinde retina damarlarında kalıcı hasara neden olur (47). Hiperoksi lipid peroksidasyonunu artırarak hücre organellerinin lizisine, membran hasarına, hücre membran fonksiyonu kaybına yol açar. Ciddi hipoksi ve iskemi de ise retinada hücresel bütünlüğün bozulması ve enerji kaybına yol açarak ROP gelişimini kolaylaştırır (48). Doğumla birlikte monitörizasyona başlama, hiperoksiden ve tekrarlayan hipoksi - hiperoksi dönemlerinden kaçınma, verilen oksijen düzeyinin ölçülmesi ve kısıtlı tutulması, ROP gelişimi ve sıklığının azaltılması için en önemli korucu faktörlerdir (17).

VEGF<sub>165/164</sub> patolojik intravitreal neovaskularizasyonla ilişkili VEGF izoformudur.. VEGF<sub>165/164</sub>, VEGF'ün diğer izoformlarından daha güçlü proinflamatuardır. Tekrarlayan oksijen değişiklikleri, yalnız başına hipoksinin tetiklediği VEGF<sub>165/164</sub> (patolojik) izoform ekspresyonundan çok daha fazladır. Fakat, VEGF'ün diğer izoformları, tekrarlayan oksijen değişiklikleri ya da hipoksinin tek başına VEGF ekspresyonunu artırması üzerine etkileri eşittir. Bununla birlikte, VEGF'in bütün izoformları, oksijenin tek devri ile karşılaştırıldığında tekrarlayan oksijen değişiklikleri tarafından daha fazla derecede artırılmaktadır. Bu bulgular prematüre bebeklerde şiddetli ROP gelişimi üzerine tekrarlayan oksijen değişikliklerin etkili olduğu anlayışını göstermektedir (50).

### *3. Hipo-hiperkarbi*

Hiperkarbi de ROP gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. Hiperkarbi ve hipokarbi atakları ve hipokarbi ile ROP'un şiddeti arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (51,52). Literatürde ROP gelişiminde hipokarbi veya hiperkarbinin rolü ile ilgili olarak birbiriyle çelişen çalışmalar da mevcuttur. Lucey ve ark.'ları (53) serebral ve retinal perfüzyonun azaldığı durumlarda ROP riskinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

### *4. Periventriküler- İntraventriküler Kanama (İVH)*

İntraventriküler hemoraji (İVH) evre 3, 4 ve periventriküler lökomalazi ile ROP arasında çok yakın bir ilişki vardır. Bu ilişkinin retinanın nöral doku yapısında olması ve santral sinir

sisteminin bazı bölgeleri ile benzer dolaşım sistemine sahip olması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. Kan akımı regülasyonundaki bozukluklar hem santral sinir sistemini hem de retina dokusunun zedelenmesine neden olmaktadır (54,55).

##### *5. Vitamin A, E*

Gelişmekte olan retinaya serbest radikallerin oksidatif zehirlenmesi de patogeneizde rol oynayabilir. Bu nedenle A ve E vitaminin antioksidan özelliklerinden teorik olarak yararlanılabilir. Yapılan iki çalışmada A vitaminin plazma düzeylerindeki düşüklük ROP gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Haftada üç kez 10.000 IU intramüsküler A vitamini verilen ileri derecede düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda eşik ROP sıklığı belirgin olarak azalmıştır (56). Prematürelere E vitaminin plazmada normal düzeyin altında olması nedeniyle çeşitli dozlarda E vitamini tedavileri denenmiş, ciddi seyirli ROP gelişimini azalttığı saptanmıştır (57).

##### *6. Transfüzyon*

Kan değişimi ve transfüzyonu sırasında kullanılan kanların erişkin tipi hemoglobin içermesi nedeniyle dokulara daha yüksek oranda oksijen gitmekte ve bu durum retina damarlarında zedeleyici etki yaparak ROP gelişimini kolaylaştırmaktadır (58). Donör kanındaki eritrositler kısa ömürlüdür ve dolaşımdan çekildiklerinde demir depolanır. Bu demir birikimine yol açarak ROP gelişiminde rol oynayabilir. Serbest demirden korunma transferin ile sağlanır, fakat prematürelere bu proteinin düzeyi de çok düşük bulunmuştur (59).

##### *7. Işık Etkisi*

Yoğun bakım ünitelerindeki ışığın ROP gelişimi üzerine etkisi tartışmalıdır. Işığa maruz kalmanın fototoksisite veya serbest oksijen radikalleri oluşturarak ROP'a yol açabileceği düşünülmektedir (60).

##### *8. Sürfaktan Tedavisi*

Sürfaktan tedavisi ile çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşam oranında belirgin artışlar elde edilmiştir. Ancak sürfaktan tedavisinin ROP sıklığını arttırmadığı düşünülmektedir.

Sıklık oranı değişmemiş olsa da yaşam oranını artırması nedeni ile ROP'tan etkilenen mutlak hasta sayısında artış olmaktadır (61,62).

### *9. Kortikosteroid Tedavisi*

Doğum öncesi dönemde steroid kullanımının hem ROP sıklığını hem de ROP şiddetini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir. Doğum sonrası dönemde kullanılan steroidlerin ROP üzerine etkisi ise, akciğer hastalığı (bronkopulmoner displazi) nedeniyle steroid tedavisi alan hastalarda araştırılmış ve kriyoterapiye giden vaka sayısını azalttığı ileri sürülmüştür (63,64).

### *10. Diğer Faktörler*

Erkek cinsiyet bazı çalışmalarda bir risk faktörü olarak bulunmuştur (65). İntrauterin gelişme geriliği ile ROP arasında da ilişki olabileceği ileri sürülmüştür (66). Sepsis ile ROP arasındaki ilişki, son çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya koymaktadır (67). İn-vitro fertilizasyon uygulanan annelerin bebeklerinde ROP sıklığı diğer tekniklerin uygulandığı annelerin bebeklerine göre daha yüksek bulunmuştur (68).

Mekanik ventilasyondaki gün sayısında artma ile ileri evrelerdeki ROP arasında anlamlı bir birliktelik saptanmıştır. Metabolik asidozu olan, resüsitasyona gerek gösteren ve APGAR skoru düşük olan bebeklerde de ROP riski artmaktadır (69).

Uzamiş total parenteral nütrisyon, bronkopulmoner displazi ve nekrotizan enterokolitin ROP için anlamlı bir risk faktörü olduğu düşünölmektedir. Doğumdan önce annenin beta-bloker kullanması, annede hipertansiyon, maternal diyabet, üçüncü trimesterde kanama, annenin hamilelikte çok sigara içmesi, çoklu doğumlar ROP gelişimini etkileyen diğer faktörleridir (65,70).

### *11. Genetik faktörler*

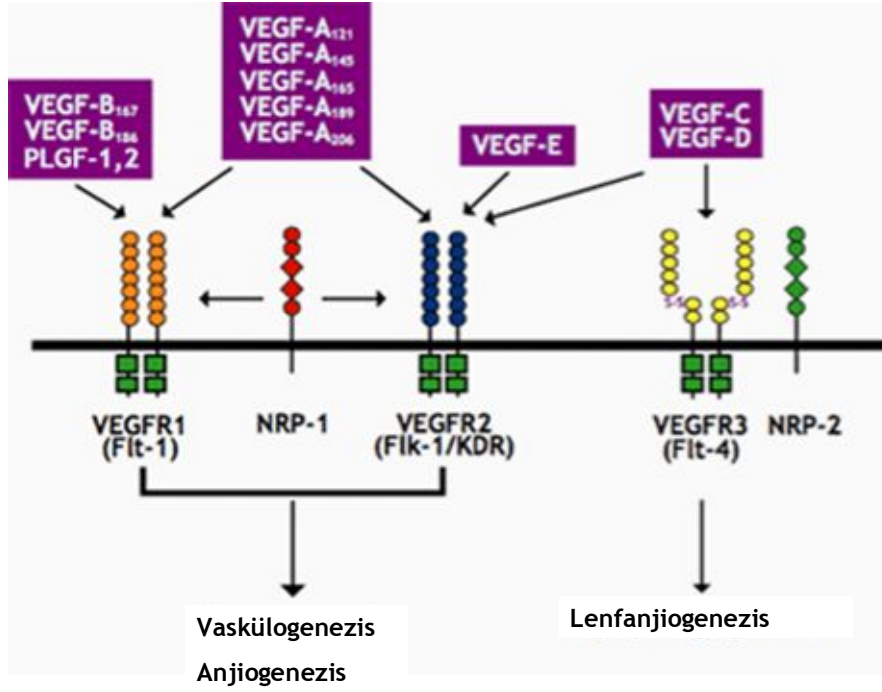
Benzer klinik özelliklere sahip bebeklerden, neden bazılarında retina dekolmanına kadar ilerleyebilen farklı şiddete ROP geliştirirken, bazılarında ROP'un gerilediği ya da ortaya çıkmadığı, çevresel faktörler dışında genetik faktörlerin de etkili olabileceğini gündeme getirmiştir (71). Genetik faktörlerin, ROP'un gelişimine katkı sağlayabileceği 1990'ların (72) başlarında bir hipotez olarak açıklanmış ve etnik gruplar arasındaki farklılıklar olasılığı desteklemiştir. ROP, beyaz ırkta siyahlardan daha sıktır ve ROP insidansı da erkek bebeklerde

kız bebeklerden daha yüksektir (73). ROP insidansının farklı ırklar arasında çeşitlilik göstermesi, ROP patogenezinde genetik faktörlerin olası rolünü göstermektedir. Son zamanlarda, genetik polimorfizm hipotezi üzerine yapılan birçok çalışma ROP'un seyrini değiştirebilir niteliktedir (71).

Fizyolojik retinal vaskülarizasyon yapıcı faktörler ile ROP patogenezinde rol oynayan faktörler benzerdir. Anjiyogenezi uyaran bir çok hormon ve/veya büyüme faktörü mevcuttur. Endotel hücre üzerinde güçlü mitojenik etkisi olan VEGF gerek **in vivo** gerekse **in vitro** olarak hipoksik ya da iskemik koşullardaki hücrelerden salınarak anjiyogenezi uyarabilmektedir. Anjiyogenezi uyaran ve/veya inhibe eden, bir kısmı endojen ve sinerjistik olan birçok faktör ya da hormon tespit edilmiştir. Bu endojen anjiyogenik aktivatörler ve inhibitörler arasındaki hassas denge ile anjiyogenez çok ince bir şekilde kontrol edilmektedir (74,75). Günümüzde ROP patogenezinde, genetik polimorfizm konusunda en sık olarak incelenen gen VEGF'dir (71). Son zamanlarda vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ile ilgili çalışmalarda yapılmaktadır.

*a. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)*

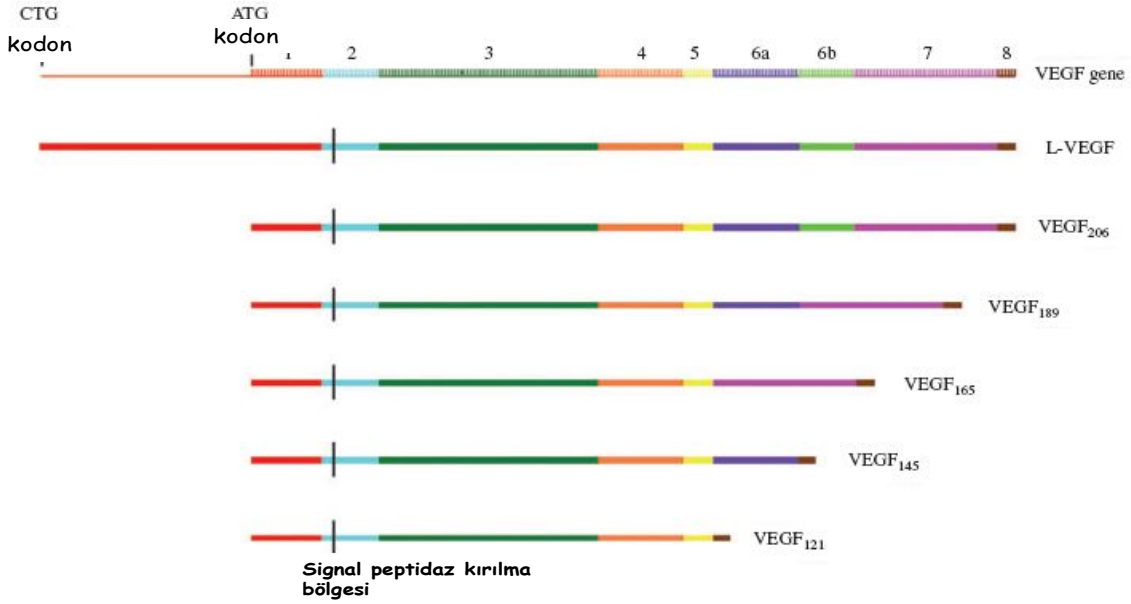
VEGF ailesi ilk olarak 1980'lerde bulundu. Bu ailenin VEGF-A (Human-VEGF olarak da adlandırılır), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, Plasental büyüme faktörü (PlGF) ve yılan zehiri VEGF'ü (svVEGF, VEGF-F) adı verilen yedi üyeden oluştuğu görülmüştür (**Şekil 2**). Literatürde yer alan birçok makalede VEGF olarak isimlendirilen büyüme faktörü, aslında Human- VEGF'ü ya da VEGF-A'yı tanımlamaktadır (76).



**Şekil 2. VEGF ailesi, bağlandıkları reseptörler ve etkileri**

VEGF-A'nın insanlarda içerdikleri aminoasit sayısı göre numarandırılan 9 izoformu tanımlanmıştır. Bunlar VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>162</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>165b/164</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>'dır. Hücre içi etkinliği ve hücre dışı matrisle bağlanma özelliği ile anjiyogenezde ana rol oynayan, bu nedenle ROP tarama ve tedavisinde en çok üzerinde çalışılan VEGF<sub>165/164</sub> izoformudur (76) (Şekil 3.)

Retinada vasküler ağ tabakasının primer oluşumu, doku oksijenasyonun etkisi ve VEGF'ün retinal astrositler ve Müller hücreleri tarafından salınması ile meydana gelmektedir. VEGF, normal ve patolojik retinal neovaskülarizasyonda major bir anjiyogenik uyarı olarak rol oynar. Aynı zamanda, immatur damarlar için önemli bir yaşamsal faktördür. VEGF, hipoksi tarafından teşvik edilen endotel hücrelerin proliferasyon ve migrasyonunu tetikleyen güçlü anjiyogenik bir faktördür. ROP gelişiminde VEGF'in önemi birçok deneysel ve klinik veri tarafından desteklenmektedir (27-28,77).



**Şekil 3. VEGF geni exon, intron ve izoformları**

*b. VEGF Reseptörleri*

VEGF ailesinin endotel hücrelerinde etki gösterebilmesi için öncelikle ona bağlanabilmesi gerekir. Bir başka deyişle, endotel hücreleri VEGF'den faydalanabilmek için onun bağlanabileceği özgül reseptörleri sentezlemesi gerekir (**Şekil 2**). Bu reseptörler beş tanedir: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1 ve sVEGFR-2. VEGFR-1 (flt-1) ve VEGFR-2 (flk-1, KDR) ilk olarak embriyogenez sırasında sentezlenirler (78,79) (**Tablo 3**).

VEGFR-reseptör 2 ( VEGFR-2, KDR, Flk-1) VEGF'ün etkilerine aracılık ederken, VEGFR-1 ise ya yanıtıcı olarak görev yapmakta ya da sinyal iletimini baskılayarak negatif bir etki göstermektedir. VEGFR-1'in rolü daha karmaşıktır (78). VEGFR-1 aktivasyonu retina damarların oksijen-bağımlı hasarını tamamen önlemek için yeterlidir. VEGFR-1'in patolojik neovaskülarizasyon üzerine etkisi bulunmamaktadır (78,79). Shih ve ark.'ları (78) yenidoğan farelerde yaptıkları çalışmalarında VEGFR-1'e spesifik bir agonistin damar canlılığı için gerekli olduğunu ve vazoproliferasyon oluşmasına veya gelişmesine yardımcı olmadığını saptamışlardır. Hatta, bu bulgular çerçevesinde prematür bebeklerde vazoproliferasyonu tetiklemeden retinal

iskemiye önlemek amacıyla VEGFR-1 spesifik ligandlarla tedavinin olası önemini vurgulamaktadırlar. VEGFR-2 çoğunlukla nöral retinadan salınır. VEGFR-2'in esas olarak anjiyogenez, proliferasyon ve migrasyon etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Deney hayvanlarında (farelerde) yapılan bazı çalışmalarda, VEGFR-2'nin eksik ya da bozuk ekspresyonunda bu hayvanların hematopoietik prekürsörlere, farklılaşmış endotel hücrelerine ve organize kan damarlarına sahip olmadıkları görülmüştür (80). VEGFR-2 yenidoğan retinasında VEGF-A etkilerinin ortaya çıkmasında önemli bir reseptördür. İskemi- bağımlı retinal neovaskülarizasyon oluşturulan bir hayvan model çalışmasında, immunohistokimyasal olarak VEGFR-1 ve VEGFR-2 düzeylerine bakılmış. VEGFR-2 normoreaktivitesi avasküler alanda damarların yakınında artarken, hipoksik retinada VEGFR-1 düzeyleri kontrol grubuyla aynı seviyelerde tespit edilmiştir. VEGFR-2 salınımı patolojik neovaskülarizasyon ve fizyolojik doğum sonrası damar gelişiminde azalma ile ilişkili bulunmuştur (78).

Reseptörler	Büyüme Faktörleri	Biyolojik Etkileri
VEGFR-1	VEGF-A VEGF-B sVEGF PIGF	Hücre-hücre ve hücre-matrix ilişkisinin kontrolü, vaskülogenez ve tuzak reseptör
VEGFR-2	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E sVEGF	Anjiyogenez, proliferasyon ve migrasyon
VEGFR-3	VEGF-C VEGF-D	Lenfanjiyogenez, lenfatik metastaz
sVEGFR-1	VEGF-A VEGF-B sVEGF PIGF	VEGFR-1'in kompetitif inhibitörü
sVEGFR-2	VEGF-A VEGF-C VEGF-D VEGF-E sVEGF	sVEGFR-1'e benzer etki (araştırmalar sürüyor)

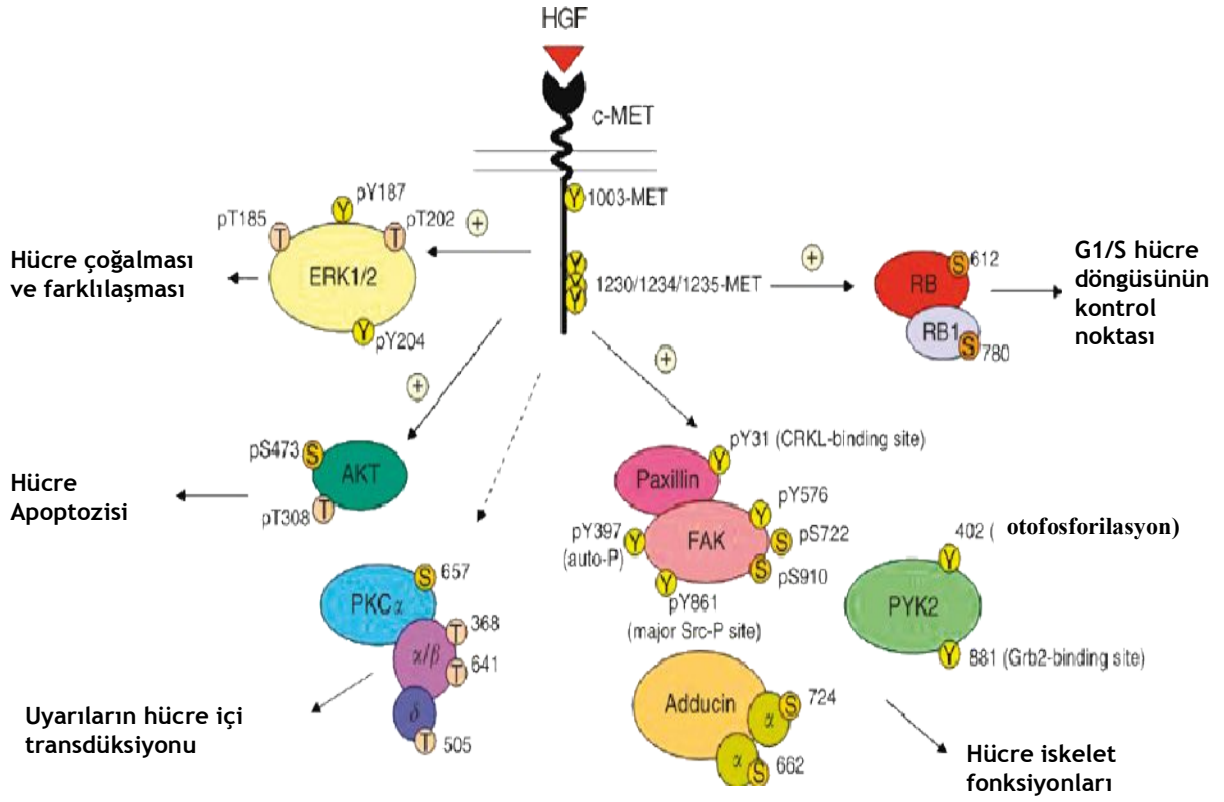
**Tablo 3. VEGF reseptörleri, ligandları ve etkileri**

### *Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) ve HGF Reseptörü (c-Met )*

HGF multifonksiyonel bir büyüme faktörüdür. HGF, anjiyogenezde önemli rol oynayan güçlü bir mitogenik, motogenik (hareketliliği sağlayan) ve morfogenik faktördür. HGF reseptörü (HGFR), c-Met olarak da bilinir. HGF, sadece mezenkimal kaynaklı hücrelerden salgılanır. Fakat, c-Met ise temel olarak epitelyal hücreler tarafından salgılanır. Bunun yanında vasküler endotel hücreleri, lenfatik endotel hücreleri, nöral hücreler, hepatositler, hematopoetik hücreler ve perisitler tarafından da salgılanır. HGF/c-Met sinyal ileti yolu sadece embriyogenez ve gelişimde rol oynamaz, aynı zamanda anjiyogenezde de önemli bir rol oynar (**Şekil 4**). HGF/c-Met birçok sinyal ileti yolu endotel hücrelerini hem direkt hem de indirekt uyarır. Motogenik (hareketliliği sağlayan) ve morfogenik etkilerini direkt olarak, diğer anjiyogenez faktörlerin düzenlenmesi tarafından indirekt olarak etkiler. HGF, endotel hücrelerinde VEGF ve VEGFR gibi anjiyogenik faktörlerin salınımını artırır. HGF/c-Met sinyal ileti yolu anjiyogenez üzerine VEGF/VEGFR ile birlikte sinerjik etki göstermektedir. Günümüzde HGF/c-Met sinyal ileti yolunun anjiyogenez üzerinde önemli bir rol oynadığı için, anjiyogenezi önlemek için umut verici bir tedavi hedefi haline gelmiştir (81,82).

Literatürde, HGF'nin ROP anjiyogenezi üzerine etkilerini gösteren fazla veri bulunmamaktadır. Lashkari ve ark.'ları (83) evre 5 ROP'lu gözlerde subretinal sıvı örneklerinde VEGF ve HGF protein seviyelerini incelemiştir. Evre 5 ROP sıvı örneklerinde hem VEGF hem de HGF seviyelerinin artmış olduğunu saptamışlardır. Çalışmalarında ROP patogenezinde HGF'in önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir.





Şekil 4. HGF/c-Met ileti yolağı ve fonksiyonları (Ma PC, Tretrakova MS, Nallasura V ve ark. *Downstream signalling and specific inhibition of c-Met/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. BrJ Cancer. 2007;97:368-377*)

## **MATERYAL VE METOD**

Bu çalışma Aralık 2006 ile Şubat 2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Oftalmoloji Birimi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonotoloji Birimi tarafından multidisipliner bir şekilde, prospektif çift kör olarak yapıldı. Çalışmaya Pediatrik Oftalmoloji Biriminde Prematürite nedeniyle takip edilen 123 bebek dahil edildi. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Etik Kurulu tarafından 7 Aralık 2006'de 2/2 protokol no ve 04/24/2006 sayı ile onaylandı. Helsinki Deklarasyonu Prensiplerine uygunluğu ise DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi etik kurulu tarafından onaylandı. Etik Kurul yönergelerine uyularak çalışmaya alınan tüm hastaların aileleri bilgilendirildi ve onamları alındı. Çalışmaya gestasyonel doğum haftası  $\leq 34$  hafta olan prematüre doğan bebekler alındı. Aile öyküsünde Familial eksudatif vitreoretinopati (FEVR) varlığı, Norrie hastalığı veya akraba evliliği ve atipik ROP varlığı bulunan prematüre bebekler çalışma dışı bırakıldı.

### *Prematüre Muayenesi:*

Prematürite nedeniyle takip edilen ya da takip edilecek olgularda fundus muayeneleri için dilatasyon amaçlı % 50 sulandırılmış Sikloplejin® ( Siklopentolat HCl %1 ) ve Tropamid® (Tropikamid %0.5) kullanıldı. İyi dilate olmayan olgularda Mydfrin® (Fenilefrin %2.5) ilave edildi. Dilatasyon amaçlı kullanılan damlalar her iki göze 5 dakika arayla iki kez damlatıldı. Prematüre bebeklerde fundus muayenesi damlalardan 45 dakika sonra ROP konusunda uzman hekimler tarafından +20D'lik lens yardımı ile indirekt oftalmoskoplara öncelikle optik disk ve maküla sonra çöktürülerek periferik retina incelendi olgular ICROP'a göre sınıflandırıldı. ROP gelişen hastalarda tedavi Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP)'ye göre düzenlendi (38). Aralık 2006- Eylül 2008 tarihleri arasında hastalar sadece klinik muayene bulgularına göre izleme alındı, Eylül 2008 tarihinden sonra ise takip edilen hastalarda klinik muayene bulguları ile birlikte ROP gelişen hastalarda özellikli olguların RetCam II (RetCam 120, Massie Lab, Pleasanton, CA, USA) görüntü kayıtları alınarak arşivlendi. ROP gelişmeyen ya da Evre I/II ROP gelişip, zamanla gerileyen olgular retina damarlanmaları tamamlanana kadar 1-2 hafta aralıklarla izlendi. Tedavi edilen hastalarda ise

fundus bulguları sakinleşene ve lazer spotları iyice belirginleşene kadar düzenli aralıklarla izlendi.

#### *Prematüre İnfantların Gruplandırılması:*

Muayene edilen bebekler nihai fundus bulgularına göre üç gruba ayrıldı.

- a. **Grup 1:** Tedavi edilen ve ileri Evre ROP hastaları (tedavi gerektiren ROP)
- b. **Grup 2:** Kendiliğinden gerileyen ROP hastaları
- c. **Grup 3:** ROP gelişmeyen prematüre bebekler- Kontrol Grubu

Çalışmaya alınan 123 prematüre bebeğin gruplara göre dağılımı; Grup 1: 42 (%34.1) olgu, Grup 2: 50 (%40.7) olgu ve Grup 3: 31 (%25.2) olgu idi.

#### *Kan Örneklerinin Alınması:*

Prematüriteliğe bağlı sistemik sorunlar nedeniyle kan transfüzyonu gerçekleştirilen hastalarda, kandaki şekilli elemanların yıkılıp temizlenmesi ve bebeklerin kanının kendini tekrar yenileme süresi olan üç aylık süre zarfında kan alınmadı. Transfüzyon gerçekleştirilen bebeklerde, ROP ve prematüriteye bağlı gelişebilecek sorunlar nedeniyle düzenli takipleri yapılırken  $\geq 3$  ay süreden sonra kan alım işlemi gerçekleştirildi. Sistemik durumu kötü olan ya da hemoglobin düzeyleri düşük/sınırdan olan olgularda kan alımı, bebeklerin iyileşme zamanına ertelendi

Kan alınma işlemi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğinde, Neonotoloji uzmanları tarafından sepsis- antisepsis kriterlerine uygun gerçekleştirildi. Çalışma kriterlerine uygun olan tüm bebeklerden çalışma süresi boyunca tek bir kez kan alındı. Kan alınacak bölge alkollü pamuk ile temizlendikten sonra her bir olgu için 2 tane EDTA'lı tüpe toplam 4 ml olacak şekilde kan alındı. Alınan kan örnekleri numarandırıldı ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

#### *Hasta örneklerinden DNA izolasyonu yapılması:*

EDTA'lı tüplere alınarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan hasta kanları oda sıcaklığına getirilerek çözüldükten sonra her bir örnekten 200  $\mu\text{l}$  alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisine aktarıldı. Bu aşamadan sonra DNA izolasyonu için Invitrogen marka "DNA izolasyon kiti" kullanılmıştır

(Invitrogen, K182104). Ependorf tüp içerisine alınan kan örneğinin üzerine 20 µl “Proteinaz K”, daha sonra ise 200 µl “lizis tamponu” eklenerek örnekler hızlıca vorteks (Labnet, Labnet International, Inc.) ile karıştırılarak homojenize edildi. Daha sonra örnekler 55 °C’lik su banyosunda (Grant, LTD6G) 15 dk inkübe edilerek eritrositlerin ve lenfositlerin parçalanarak hücre içeriğinin serbest kalması sağlandı. İnkübasyon sonunda örneklerin üzerine 500 µl %96’lık etanol (Applichem, A3678) eklenerek vorteks ile homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler DNA bağlayıcı özelliği olan kolonlar içerisine yüklenerek 10,000 g’de 1 dk santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5415R) edildi. Santrifügasyon ile örneklerde bulunan DNA kolona bağlı kalırken diğer kan bileşenleri kolonun altında bulunan toplama tüpüne geçmesi sağlandı, böylece lenfosit DNA’ları diğer kan elemanlarından ayrıldı. Kolona takılan DNA dışındaki bileşenlerin temizlenmesi amacıyla kolonlar kit içerisinde bulunan “yıkama tamponları” ile muamele edilerek 10,000 g de tekrar santrifüjlendi. Son olarak kolona bağlı DNA’yı izole etmek için “elüsyon tamponu” kolona eklendi ve 16,000 g’de 3 dk santrifüjlenerek DNA nın kolondan ayrılması sağlandı. İzole edilen DNA’lar sonraki işlemler için +4 °C sıcaklıkta saklandı.

#### *DNA kalitesi ve miktarının belirlenmesi:*

İzole edilen DNA’ların miktar ölçümleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Elde edilen DNA örneklerinden 2,5 µl alınarak “Picodrop spektrofotometre” (Thermo Picodrop 1.0) ile 260 nm ve 280 nm’deki absorpsiyonları ölçüldü. 260 nm’deki absorpsiyon değerleri DNA miktarını belirlemek için kullanılırken, 260/280 oranı elde edilen DNA’nın saflığını belirlemek için kullanıldı (84). Elde edilen DNA’lar, DNA saflığının 1.6-2.1 aralığında olması ve 50-100 ng/µl miktarında ise izolasyon başarılı olarak kabul edildi ve bir sonraki basamağa geçildi.

İzole edilen DNA’ların kalite kontrolü ve PCR reaksiyonlarında kullanılabilirliğini test etmek için de DNA agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Bunun için ilk önce 0.5x-TBE (Tris-borat-EDTA) tamponu içerisinde %2 agaroz (Applichem, A2114) içeren jeller hazırlandı. DNA’nın agaroz jel içerisinde görünür hale getirilmesi amacıyla 1 µg/ml konsantrasyonunda etidyum-bromür (E7637-1 G, SIGMA) eklendi. Jeller donduktan sonra her bir DNA örneğinden 200 ng alınarak 6x-yükleme tamponu (Fermentas, R1151) ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. Jeller 0.5x-TBE tamponu içeren elektroforez tankında (Amersham Biosciences) akımdan negatif kutuptan (-) pozitif kutba (+) doğru yürütüldü ve örnekler 2 saat yürütüldükten sonra jeller

ultraviyole ışığı altında translüminatör (Vilber Lourmat, Infinity-Capt.) ile görüntülendi. Her bir örnek için DNA'nın tek bant şeklinde görülmesi halinde bu DNA kaliteli olarak kabul edildi.

*İncelenecek gen bölgelerinin seçimi ve primer tasarımı:*

İncelenecek olan VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met genlerine ait referans dizileri Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) bünyesinde bulunan Ulusal Tıp Kütüphanesi (NLM)'nin Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) veritabanından indirildi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Kullanılan referans dizilere ait erişim kodları aşağıda listelenmiştir.

**VEGF:** AF095785 (promotor), NM\_001025366 (mRNA)

**VEGFR:** X89776 (promotor), NM\_002253 (mRNA)

**HGF:** E09626 (promotor), NM\_000601 (mRNA)

**c-Met:** AF046925 (promotor), NM\_000245 (mRNA)

Daha sonra bu genlere ait promotor bölgeler primer 3 programı kullanılarak primer tasarımı işlemine geçildi. VEGF geni için literatürde daha önce ROP ile ilişkili olabileceği öne sürülen -1498. (literatürde -460 olarak da geçmektedir) ve -634. (literatürde +405 olarak da geçmektedir) nükleotidlerdeki polimorfizlerin belirlenmesi amacıyla iki farklı primer tasarımı. -1498. nükleotidte bulunan polimorfizmi belirlemek için, bu nükleotidin 400 bp (baz çifti) ilerisinde ve 400 bp gerisinde bulunan diziler seçilerek elektronik bir primer tasarımı programı olan "Primer 3" programına aktarıldı (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). GC-içeriği düşük, 3'-ucunda baz eşleşmeleri içermeyen, bağlanma sıcaklıkları birbirine yakın olan primer çiftleri Primer 3 programı yardımıyla hazırlanarak seçildi. Bu primer çifti daha sonraki basamaklarda -1498. nükleotidi içerecek şekilde ilgili gen bölgesinin PCR ile çoğaltılmasında ve sonrasında PCR ürününün dizileme ile belirlenmesinde kullanıldı. -1498. nükleotidten farklı olarak, -634. nükleotidin olduğu bölge bir restriksiyon enzimi tanıma noktası olduğundan, bu noktadaki polimorfizmlerin belirlenmesi için restriksiyon enzimi kesimine uygun bir primer çifti tasarlanmıştır. Yine -634. nükleotidin 400 bp ileri ve gerisindeki alan seçilerek primer 3 programına aktarılarak bu bölgeyi PCR ile çoğaltmaya ve restriksiyon enzimi kesimine uygun primer çiftleri tasarlandı.

VEGF geninin promotor bölgesinde bulunan -1498. ve -634. nükleotidlerdeki polimorfizmler spesifik olarak belirlenirken, literatürde çalışmamızda ilk kez yapıldığı için VEGFR, HGF ve c-Met genlerinin minimal promotor bölgeleri dizileme yöntemi ile tamamen tarandı. Bu amaçla ilgili genlerin promotor bölgeleri alınarak Primer 3 programında maksimum 800 bp (dizileme yönteminin üst sınırı) olacak şekilde primer çiftleri tasarlandı. Uygun primer çiftleri seçildiğinde bu genlerin PCR ile çoğaltılabilecek olan nükleotidleri aşağıdaki gibi oluşturuldu.

**VEGFR:** -36 ve -600 arasındaki 564 bp uzunluğundaki bölge

**HGF:** +17 ve -575 arasındaki 558 bp uzunluğundaki bölge

**c-Met:** -23 ve -477 arasındaki 454 bp uzunluğundaki bölge

Primer çiftleri tasarlandıktan sonra ticari olarak Avusturya'dan MWG firmasına her bir primer çiftinden 0.5 nmol olacak şekilde sentezletirildi ve liyofilize olarak teslim alındı. Liyofilize durumdaki primerler,  $\mu\text{l}$ 'de 100 pmol primer içerecek şekilde DNaz, RNaz içermeyen moleküler biyolojik düzeyde distile su ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) ile sulandırıldı. PCR reaksiyonları için ise, 100 pmol konsantrasyonundaki stok primerlerden 1:10 dilüsyon yapılarak optimizasyon sonrası uygun bulunan 10 pmol konsantrasyonunda çalışma primerleri oluşturuldu. Hem stok, hem de çalışma konsantrasyonundaki primerler  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı. PCR reaksiyonundan önce primerler oda sıcaklığına getirilip çözülerek kullanıldı. Tasarlanan bütün primer dizileri **Tablo 4**'de verildi.

**Tablo 4. Tasarlanan primer dizileri ve beklenen ürün uzunlukları.**

İncelenen bölge	Primer yönü (5'-3')	Primer dizisi	Beklenen PCR ürünü uzunluğu
VEGF -1498	İleri	AAGCCCATTCCTCTTTAGC	339 bp
	Geri	AGGGAGCAGGAAAGTGAGGT	
VEGF -634	İleri	ACTTCCCCAAATCACTGTGG	481 bp
	Geri	GCCCGAGCTAGCACTTCTC	
VEGFR	İleri	GGCAAGCGATTAAATCTTGG	564 bp
	Geri	GGGAGCCGGTTCTTTCTC	
HGF	İleri	CGCTTTCTTCTTGCTGCT	558 bp
	Geri	AGTTTGGTCACCCACATGGT	
c-Met	İleri	CCATGCCGTATCAGGAAATC	454 bp
	Geri	GATATCTTCGTTATTGAAAGTCATGG	

*PCR reaksiyonların optimize edilmesi:*

PCR reaksiyon koşullarının ve eklenecek konsantrasyonun belirlenmesi için bir seri optimizasyon reaksiyonu kuruldu. Optimize edilen koşullar arasında primerlerin konsantrasyonları ve bağlanma sıcaklıkları (annealing temperature), MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu, PCR reaksiyonunun döngü sayısı (cycle number) bulunmaktadır. Her bir primer çifti için Primer 3 programında hesaplanan teorik bağlanma sıcaklıkları ile optimizasyon deneylerine başlandı. Bu sıcaklıkta farklı MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarında (1,5 mM, 3 mM ve 4.5 mM) PCR reaksiyonları kurulduktan sonra elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezine yüklenerek görüntülendi. Tüm denemeler sonunda tek bir keskin bant veren non-spesifik bant içermeyen PCR reaksiyon koşulları optimum olarak kabul edildi ve sonraki basamaklarda bu koşullar kullanıldı. Her bir primer çifti için optimize edilen koşullar **Tablo 5**'de gösterildi.

**Tablo 5. Her bir primer çifti için optimum olduğu belirlenen PCR koşulları.**

Primer çifti	Bağlanma sıcaklığı	MgCl <sub>2</sub> konsantrasyonu	Döngü sayısı
VEGF, -1498	57 °C	2 mM	33
VEGF, -634	60 °C	1.5 mM	35
VEGFR	59 °C	3 mM	30
HGF	57 °C	1.5 mM	33
c-Met	56 °C	3 mM	35

*İlgili gen bölgelerinin PCR reaksiyonları ile çoğaltılması:*

VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met polimorfizmlerinin belirlenmesi için ilgili gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı. Her bir gen için genin ilgili bölgesine spesifik olarak tasarlanan primer çiftleri PCR reaksiyonlarında kullanıldı. PCR reaksiyonlarında, kalıp olarak kullanılan hasta örneği sayısına göre ana-karışım (mastermix) hazırlandı. Ana-karışım içerisinde kullanılan stok malzemeler şu şekildedir:

- 10x-PCR tamponu (Fermentas, B34),
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, R0971),
- 10 mM dNTP-set (Fermentas, R1122),
- 10 pmol gen spesifik primer çifti,
- 5 unit/ul Taq DNA polimeraz (Fermentas, EPO402),
- Moleküler biyolojik düzeyde dH<sub>2</sub>O (Gibco, 10977023).

Her bir PCR reaksiyonu 50 µl hacimde oluşturuldu. 50 µl'lik bir PCR reaksiyonu için kullanılan malzemelerin son konsantrasyonları ise şu şekilde idi: 1x-PCR tamponu, her bir primer çifti için farklı olarak optimize edilen MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu (yukarıdaki tabloda optimize koşullar verildi), 0.2 mM dNTP-set, 0.2 pmol/µl primer çifti, 2.5 ünite Taq DNA polimeraz. Bu



şekilde ana-karışım hazırlandıktan sonra 0.2 ml hacimdeki PCR tüpleri (Greiner, 652201) içerisine eşit olarak dağıtıldı ve en son olarak da her bir tüpe farklı hastalara ait DNA örneklerinden 100 ng olacak şekilde eklendi. Kontrol olarak DNA içermeyen dH<sub>2</sub>O eklenmiş PCR karışımı kullanılmıştır. Örnek DNA'lar da eklendikten sonra tüpler santrifüj ile spin edilerek tüpün çeperlerinde kalan reaksiyon bileşenleri çöktürüldü. Ardından örnekler Techne marka (TC-512) termal-döngüleyici (Thermal-Cycler) içerisine yerleştirilerek her bir primer çiftine göre optimize edilen koşullarda cihaz programlandı. Programlanan döngüler ve süreleri aşağıdaki gibidir:

95 °C'de 5 dk (başlangıç denatürasyonu)  
30-35 tekrar  $\left\{ \begin{array}{l} 95 \text{ °C'de } 1 \text{ dk (denatürasyon)} \\ 56-60 \text{ °C'de } 1 \text{ dk (uzama)} \\ 72 \text{ °C'de } 1 \text{ dk (sentez)} \end{array} \right.$   
72 °C'de 5 dk (son sentez)  
4 °C'de bekletme (koruma)

Programlanan döngü bittikten sonra reaksiyonlar cihazdan alınarak +4 °C'de saklandı. Sonuçlar 5'er µl PCR alınarak % 2'lik agaroz jelde yürütülmesi ile değerlendirildi. Bunun için 5 µl PCR örneği 1 µl 6X-yükleme tamponu ile karıştırıldı ve elde edilen 6 µl'lik örnek %2 konsantrasyonda daha önceden dökülen agaroz jellerin kuyularına yüklendi. Bütün örneklerin en başına da, uzunlukları bilinen ticari belirteç DNA (Fermentas) örneğinden de 0.5 µg oranında yükleme yapıldı. Agaroz jeller 0,5X-TBE tamponu içerisinde 70 V'da 60 dk yürütülerek örnek DNA'ların açılması sağlandı. Yürütme işleminin sonunda jeller UV-transilluminatör altında incelendi ve PCR ürünlerinin bant verip vermediği, ayrıca bandın belirteç DNA'ya göre doğru büyüklükte olup olmadığı kontrol edildi. Belirteç DNA dikkate alındığında uygun büyüklükte bant veren, ayrıca non-spesific bantlar içermeyen PCR örnekleri sonraki basamaklar olan dizileme ve restriksiyon enzim kesimi için kullanıldı.

*Restriksiyon enzim kesimi ile polimorfizm belirlenmesi:*

VEGF -634. nükleotidde bulunan polimorfizmin belirlenmesi amacıyla BsmFI restriksiyon enzimi (New England Biolabs, R0572) kullanıldı (**EK-1**). Bu enzimin kullanılmasının nedeni VEGF -634. nükleotidi de içeren bölgenin bu enzimin tanıma dizisi olan 5'...GGGAC(N)<sub>10</sub>...3' 'yı içermesidir. Polimorfizm varlığında bu kesim noktası ortadan kalkar. VEGF geninin -634. nükleotidini içeren kısmı spesifik olarak tasarlanan primer çiftleri kullanılıp PCR ile çoğaltıldıktan sonra PCR ürününden 10 µl alınarak kesim işlemine geçildi. Restriksiyon kesiminde, BsmFI restriksiyon enziminden 10 ünite ve bu enzimin en iyi çalıştığı tampon olan NEB tamponundan (Buffer-4, New England BioLabs Inc.) da 1 µl alınarak PCR ürünleri ile karıştırıldı. Elde edilen karışım termal döngüleyici içerisine alınarak aşağıdaki programda kesim işlemi yapıldı:

60 °C'de 60 dk (kesim)

80 °C'de 20 dk (enzim inaktivasyonu)

4 °C'de bekletme (koruma)

Kesim işlemi sonunda örneklerin tamamı (20 µl) 6x-yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra %2'lik agaroz jellere yüklendi. Bant büyüklüklerini belirlemek için 100 bp lık DNA-belirteci kullanıldı. Örnekler 70 V'da 60 dk yürütüldükten sonra UV-ışığı altında görüntülendi. İncelenen örneklerde kesim ürünlerinin varlığı ve yokluğuna bakılarak polimorfizm olup olmadığı aşağıdaki özelliklere göre belirlenmiştir:

- Spesifik primer çiftleri ile başlangıçta çoğaltılan VEGF gen bölgesinin uzunluğu 481 bp'dir.
- BsmFI restriksiyon enzimi, -634. nükleotidin de içinde olduğu 5'...GGGAC(N)<sub>10</sub>...3' tanıma dizisine sahiptir ve bu tanıma dizisi normal bireylerde bulunan dizidir.
- Normal bir bireyden gelen örnekler BsmFI restriksiyon enzimi ile muamele edildiğinde, enzim tanıma dizisinden kesim yapacağı için 181 bp'lik ve 300 bp'lik iki DNA bantı görülür.

- Eğer birey homozigot olarak -634. n k­leotidde polimorfizm taşıyorsa BsmFI'in tanıma dizisi değişmiş olacağından enzim kesim yapmayacaktır ve doğal olarak 481 bp'lik tek bir bant görülecektir.
- Eğer birey heterozigot ise, allellerden birisi BsmFI tarafından kesilecek, diğeri ise kesilmeyecektir. Sonuç olarak jelde hem kesilmemiş 481 bp'lik bant, hem de kesilmiş 181 bp'lik ve 300 bp'lik olmak üzere toplam 3 adet bant görülecektir.

Bu şekilde bütün kesim ürünleri incelenerek polimorfizm içerip içermedikleri ve bu polimorfizm açısından homozigot ya da heterozigotlukları belirlenmiştir.

*DNA dizi analizi (sequencing yöntemi ile n k­leotid değişimlerinin belirlenmesi):*

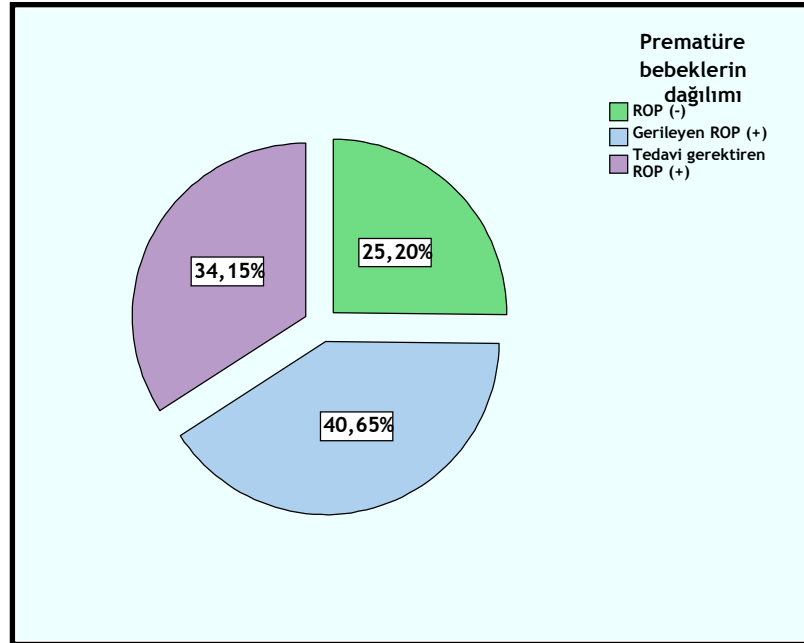
VEGF -1498. n k­leotid için ve VEGFR, HGF ve c-Met genlerinin minimal promotor bölgelerinin taranması için DNA dizi analizi yöntemi kullanıldı. Bu genlere ait taranacak bölgeler spesifik primer çiftleri ile yukarıda PCR reaksiyonları kısmında anlatıldığı gibi çoğaltıldı. Örneklerin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi sonrasında spesifik olmayan intakt bantları olan örneklerin 45  l'si dizileme için kullanıldı. Dizileme işlemi için Macrogen firmasından hizmet alımı yaptırıldı. Her bir örneğin dizilemesi hem ileri (forward) hem de geri (reverse) yönde olmak üzere iki kez kontrollü olarak yinelendi. Dizi analizi sonuçlarının ‘‘pik’’ değerleri incelenerek güvenilir olduğu kontrol edildikten sonra elde edilen dizilerin her biri referans dizileri ile karşılaştırılarak n k­leotid değişimlerinin olup olmadığına (mutasyon ya da polimorfizm) değerlendirilmiştir. Değişim görülen örnekler doğrulanması için 2. kez dizilenmiştir. Ayrıca dizileme sonucunda tam olarak okunmayan ve kromatogramı üzerindeki piklerde karşıklık olan örnekler bulunduğunda da bu örnekler yeniden dizilenmiştir. VEGF-460, VEGFR, HGF ve c-Met genlerinin minimal promotor bölgelerinin referans dizileri sırasıyla **EK-2, EK-3, EK-4 ve EK-5** de verilmiştir.

### *İstatistiksel Değerlendirme*

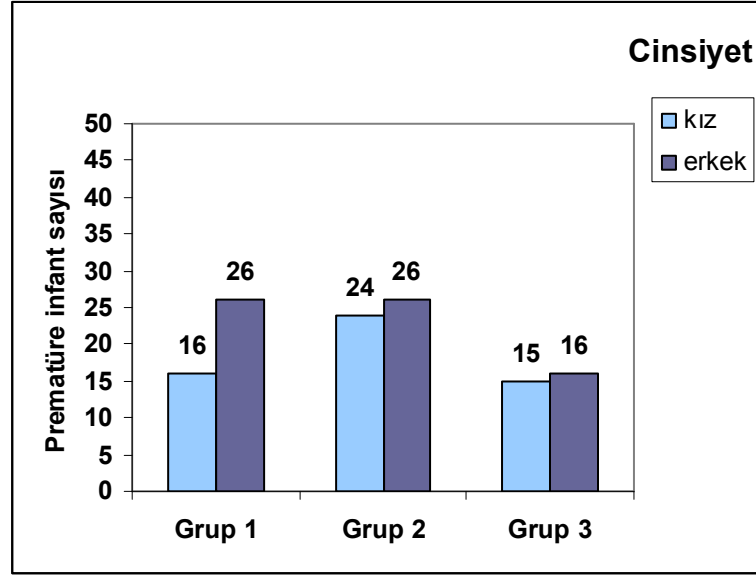
Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analiz için SPSS 15.0 bilgisayar paket programı (Statistical Program in Social Sciences) kullanılarak yapılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve Post Hoc test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Pearson Ki-kare testi kullanıldı. Gruplar arası varyans analizinde Bonferroni düzeltmesi kullanıldı. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık  $p<0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## **BULGULAR:**

ROP progresyon ve regresyonunun VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met promotor gen polimorfizm ile ilişkisini anlamak amacıyla, çalışmaya toplam 92 ROP gelişen prematüre bebek dahil edildi. Kontrol grubu olarak ROP gelişmeyen 31 prematüre bebek alındı. Toplam 123 prematüre bebeğin dağılımı (**Şekil 5**); 42 (% 34.15) olgu Grup 1, 50 (% 40.65) olgu Grup 2 ve 31 (% 25.2) olgu ise Grup 3 (Kontrol grubu) şeklinde idi. Çalışmaya alınan tüm bebeklerin 55'i (% 44.7) kız ve 68'i (% 55.3) erkek idi. Cinsiyet dağılımı yönünden gruplara bakıldığında, Grup 1'de 16 (%38.1) kız ve 26 (% 61.9) erkek, Grup 2'de 24 (% 48) kız ve 26 (% 52) erkek ve Grup 3'te ise 15 (%48.4) kız ve 16 (%51.6) erkek idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.568$ , **pearson Ki-kare testi**). Çalışmamızda, prematüre olarak doğan bebeklerde erkek cinsiyet kız cinsiyetten daha fazla bulundu. Fakat, cinsiyet ve şiddetli ROP arasında ilişki saptanmadı. Grupların cinsiyet dağılımı **Şekil 6**'da görülmektedir.



**Şekil 5. Prematüre bebeklerin dağılımı**



Şekil 6. Grupların cinsiyet dağılımı

Tüm prematüre bebeklerin gestasyonel yaşları 24 ile 34 hafta arasında değişmekte olup, ortalama  $29.6 \pm 2.4$  haftaydı. Doğum ağırlıkları ise 595 ile 2700 gr arasında olup, ortalama  $1289.2 \pm 354.8$  gr idi. Grup 1 bebeklerin doğumda ortalama gestasyonel yaşları  $28.2 \pm 2.4$  hafta, ortalama doğum ağırlığı ise  $1141.4 \pm 372.7$  gr olarak bulundu. Grup 2 bebeklerin doğumda ortalama gestasyonel yaşları  $29.7 \pm 2.0$  hafta ve ortalama doğum ağırlığı ise  $1305.9 \pm 290.4$  gr olarak saptandı. Grup 3'te (Kontrol Grubu) ise doğumda ortalama gestasyonel yaşları  $31.5 \pm 1.8$  hafta ve ortalama doğum ağırlığı ise  $1462.5 \pm 349.8$  gr olarak saptandı. Grup 1'teki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları Grup 2 ve Grup 3'teki bebeklere göre anlamlı derecede düşüktü. Doğumda ortalama gestasyonel yaş açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ( $p=0.0001$ ). Grup 1'deki bebeklerin ortalama doğum ağırlıkları da Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı düşük saptandı. Fakat gruplar arasında ortalama doğum ağırlığı yönünden sadece Grup 1 ve Grup 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). Grup 1 ve 2 ile Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Sırasıyla;  $P=0.62$ ,  $P=0.13$ ). ROP gelişim riski ve şiddeti ile düşük gestasyonel yaş ve düşük doğum ağırlığı arasında korelasyon bulunmaktadır. Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı düştükçe ROP gelişim riski artmaktadır. Prematüre bebeklerin demografik özellikleri **Tablo 6**'da verildi.

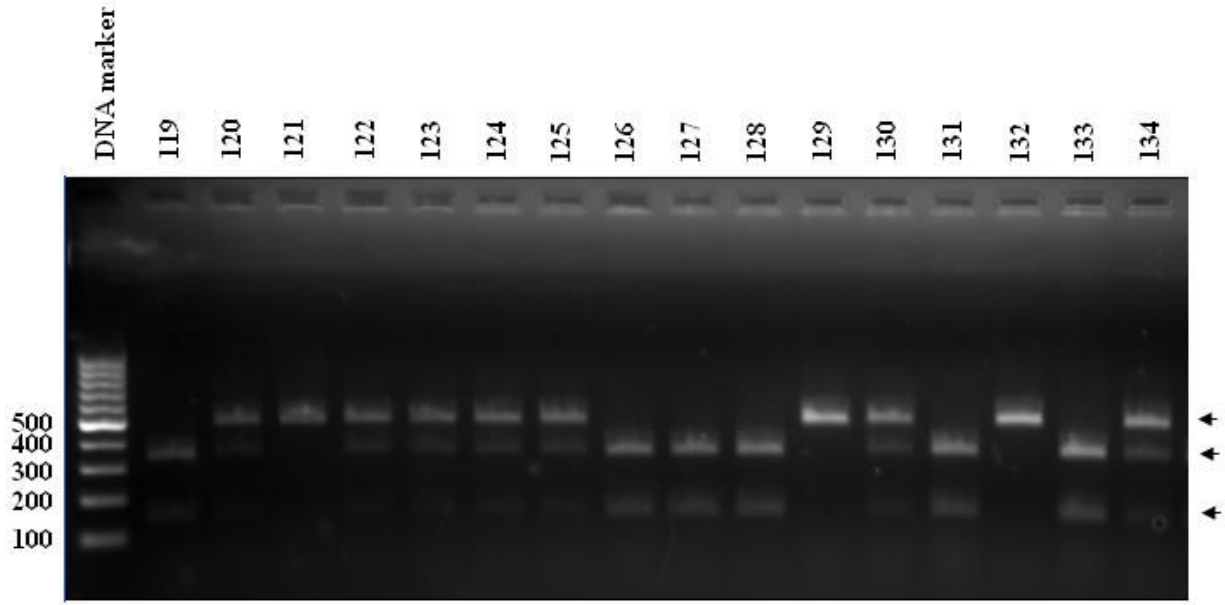
**Tablo 6. Prematüre bebeklerin dağılımı ve demografik özellikleri**

	ROP (-)	Regrese ROP(+)	Tedavi gerektiren ROP(+)	P
Prematüre bebek sayısı (%)	31 (25.2)	50 (40.7)	42 (34.1)	
Cinsiyet (Kız/Erkek)	15/16	24/26	16/26	0.568*
Doğumda gestasyonel yaş (±SD)	31.5±1.8	29.7±2.0	28.2±2.4	<0.001#
Doğum ağırlığı (±SD)	1462.5±349.8	1305.9±290.4	1141.4±372.7	<0.001#

*P*\*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

*P*#: ANOVA testi

Olgular VEGF -634 polimorfizmi açısından değerlendirildiğinde **Resim 6**'da Örnek jel elektroforezi sonucunda da görüleceği gibi genin her iki alelinde de polimorfizm saptanmayan (119, 126, 127, 128, 131 ve 133) ve bu nedenle enzim kesim bölgesi değişmeyen olguların yanı sıra VEGF -634 polimorfizmi açısından heterozigot (125, 130 ve 134) olduğu için kesim bölgesi kaybolan ve kesilen aleleri bir arada bulunduran olgular ve homozigot (121, 129 ve 132) olduğu için her iki aleli de restriksiyon enzimi tarafından kesilemeyen olgular saptanmıştır.



**Resim 6. Görüldüğü gibi 119, 126, 127, 128, 131 ve 133 numaralı hastalarda kesim sonucunda iki bant oluşmuştur, bu görünüm yabancı genotipi göstermektedir. 120, 122, 123, 124, 125, 130 ve 134 numaralı hasta örneklerinde ise hem kesilmiş hem de kesilmemiş olmak üzere üç bant görülmektedir, bu örneklerde heterozigot polimorfizm taşıyıcısı olduğunu göstermektedir. 121, 129 ve 132 numaralı örneklerde ise kesim olmamıştır, tek bir bant içeriyor, bu örnekler ise homozigot polimorfizm taşıyıcılığı göstermektedir.**

VEGF-634 polimorfizm analizinde, Grup 1'i oluşturan 42 prematüre bebeğin 17'sinde (% 40.5) polimorfizm saptanırken, 25'inde (%59.5) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 1 prematüre bebeklerin genotip dağılımına bakıldığında; 25' inde (%59.5) yabancı (G/G), 11' inde (%26.2) heterozigot (G/C) ve 6'sında (%14.3) homozigot (C/C) oldukları saptandı. Grup 1 preterm bebeklerin alel sıklığı, 61 adet Guanin (%72.6) ve 23 adet Sitozin (%27.4) haplotipi olarak belirlenmiştir. Grup 2'i oluşturan 50 prematüre bebeğin 21'inde (%42.0) polimorfizm saptanırken, 29'da (%58.0) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 2 prematüre bebeklerin 29'ında (%58.0) yabancı (G/G), 18' inde (%36.0) heterozigot (G/C) ve 3'ünün (%6.0) homozigot (C/C) genotipe sahip oldukları saptandı. Grup 2 preterm bebeklerin alel sıklığı, 76 adet Guanin (%76.0) ve 24 adet Sitozin (%24.0) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31



prematüre bebekten 11'inde (%35.5) polimorfizm saptanırken, 20'sinde (%64.5) polimorfizm saptanmadı (Şekil 7). Kontrol grubundaki bebeklerin 20'sinde (%64.5) yabani (G/G), 8' inde (%25.8) heterozigot (G/C) ve 3'ünün (%9.7) homozigot (C/C) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol grubundaki preterm bebeklerin alel sıklığı, 48 adet Guanin (%77.4) ve 14 adet Sitozin (%22.6) haplotipi olarak belirlendi (Tablo 7).

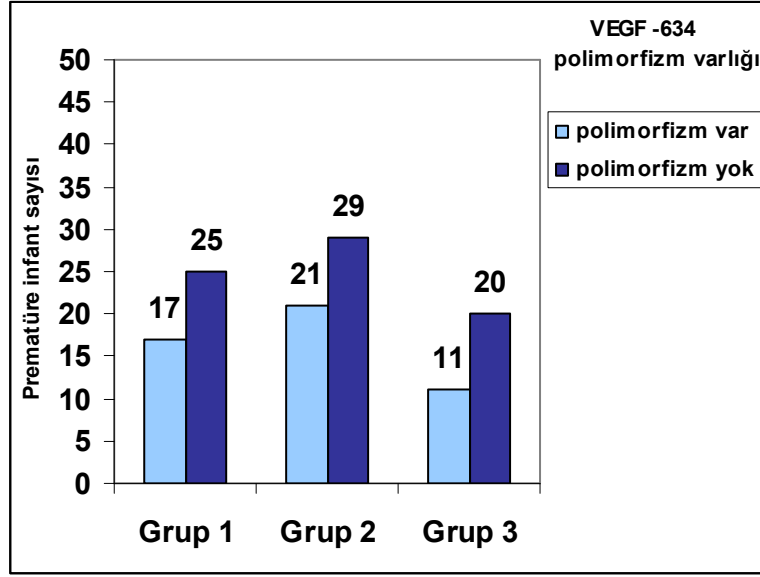
Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGF-634 G→C polimorfizmi varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.840$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.604$ ). Aynı gruplar, VEGF-634 G/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.802$ ). VEGF promotor gen analiz sonuçlarına göre VEGF-634 G→C tek nükleotid polimorfizmin ROP gelişimi ve şiddeti üzerine önemli bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir.

**Tablo 7. Üç grubun VEGF-634 G > C genotip dağılımı ve alel sıklığı**

Polimorfizm	VEGF-634(+405)G > C		
	ROP (-)	Regrese ROP	Tedavi gerektiren ROP
A/A (%)	20 (64.5)	29 (58.0)	25 (59.5)
A/a (%)	8 (25.8)	18 (36.0)	11 (26.2)
a/a (%)	3 (9.7)	3 (6.0)	6 (14.3)
<i>P</i>		0.604	
<b>Alel sıklığı</b>			
A	0.774	0.760	0.726
a	0.226	0.240	0.274

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel



**Şekil 7. Graplardaki VEGF-634 polimorfizm varlığı**

DNA analizi ile incelenen VEGF-460 polimorfizm analizinde, Grup 1’i oluşturan 42 prematüre bebeğin 25’inde (%59.5) polimorfizm saptanırken, 17’inde (%40.5) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 1 prematüre bebeklerin genotip dağılımı, 17’inde (%40.5) yabanıl (T/T), 18’inde (%42.9) heterozigot (T/C) ve 7’inde (%16.7) homozigot (C/C) oldukları saptandı. Grup 1 preterm bebeklerin alel sıklığı, 52 adet Timin (%61.9) ve 32 adet Sitozin (%38.1) haplotipi olarak belirlenmiştir. Grup 2’i oluşturan 50 prematüre bebeğin 29’unda (%58.0) polimorfizm saptanırken, 21’inde (%42.0) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 2 prematüre bebeklerin 21’inde (%42.0) yabanıl (T/T) (Şekil 8), 20’inde (%40.0) heterozigot (T/C) (Şekil 9) ve 9’unda (%18.0) homozigot (C/C) (Şekil 10) genotipe sahip oldukları saptandı. Grup 2 preterm bebeklerin alel sıklığı, 62 adet Timin (%62.0) ve 38 adet Sitozin (%38.0) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31 prematüre bebekten 20’inde (%64.5) polimorfizm saptanırken, 11’inde (%35.5) polimorfizm saptanmamıştır (Şekil 11). Kontrol grubundaki bebeklerin 11’inde (%35.5) yabanıl (T/T), 16’inde (%51.6) heterozigot (T/C) ve 4’ünde (%12.9) homozigot (C/C) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol grubunu oluşturan preterm bebeklerin alel sıklığı, 38 adet Timin (%61.3) ve 24 adet Sitozin (%38.7) haplotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 8).

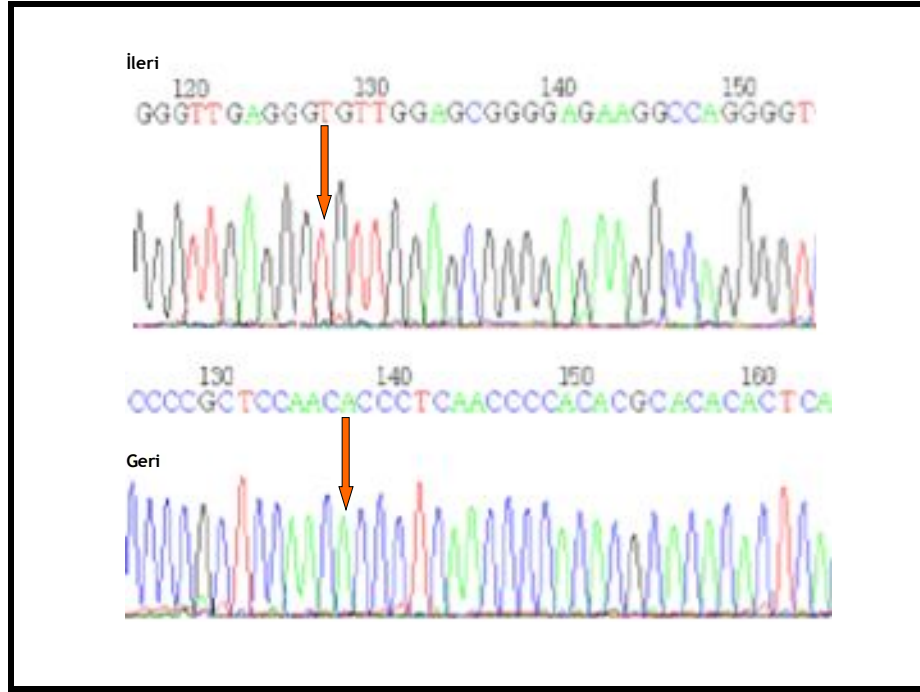
Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGF-460 T→C polimorfizmi varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.840$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.890$ ). Aynı gruplar, VEGF-460 T/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.905$ ). VEGF-460 T→C tek nükleotid polimorfizm prevalansı tüm gruplarda yüksek bulunmuştur. Fakat, VEGF-460 T→C promotor gen polimorfizm varlığı ile ROP gelişim riski ve progresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

**Tablo 8. Üç grubun VEGF-460 T > C genotip dağılımı ve alel sıklığı**

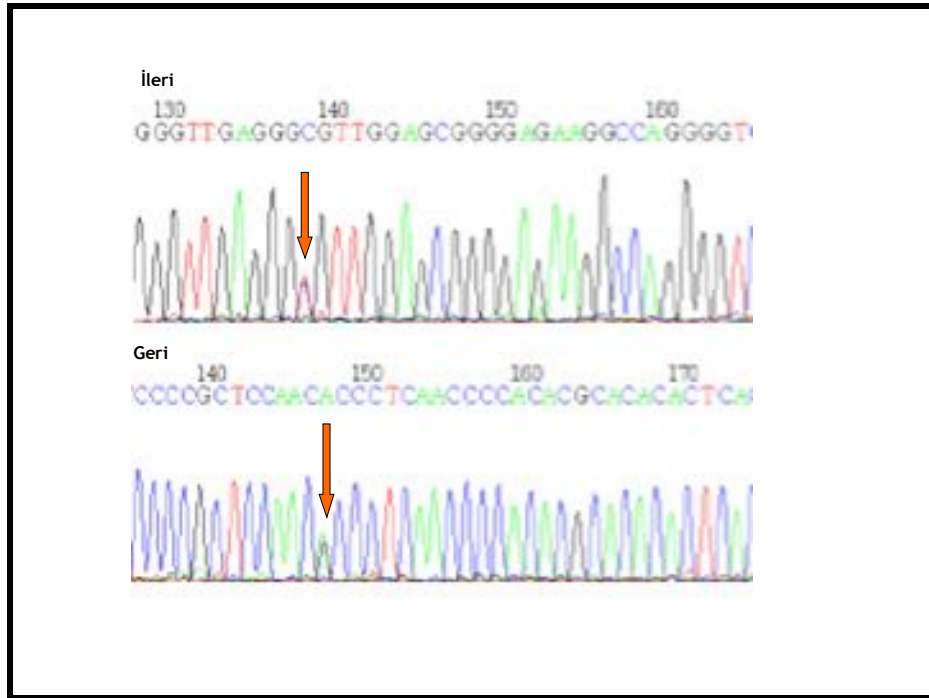
Polimorfizm	VEGF-460 T > C		
	ROP (-)	Regrese ROP	Tedavi gerektiren ROP
A/A (%)	11 (35.5)	21 (42.0)	17 (40.5)
A/a (%)	16 (51.6)	20 (40.0)	18 (42.9)
a/a (%)	4 (12.9)	9 (18.0)	7 (16.7)
<i>P</i>		0.890	
<b>Alel sıklığı</b>			
A	0.613	0.620	0.619
a	0.387	0.380	0.381

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

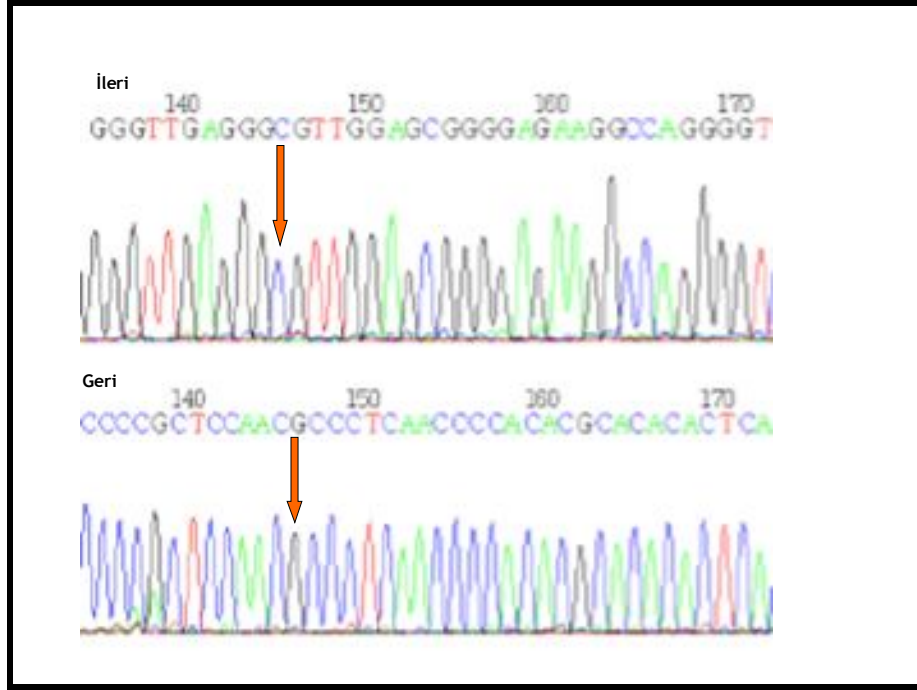
A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel



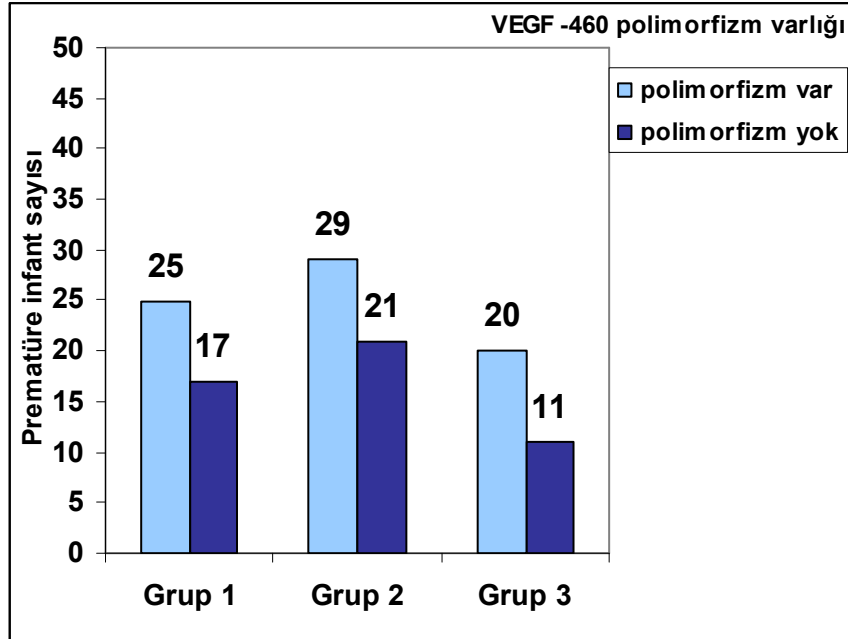
Şekil 8. 15 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 polimorfizm noktasında T/T yabancı genotipi



Şekil 9. 19 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 heterozigot T/C genotipi



Şekil 10. 24 Nolu DNA örneğinde, VEGF-460 homozigot C/C genotipi



Şekil 11. Gruplardaki VEGF-460 polimorfizm varlığı

DNA dizi analizi yöntemi ile gerçekleştirilen VEGFR+32 polimorfizm analizinde, Grup 1'i oluşturan 42 prematüre bebekten 14'ünde (%33.3) polimorfizm saptanırken, 28'inde (%66.7) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 1 prematüre bebeklerin genotip dağılımı, 28'inde (%66.7) yabanıl (G/G) (**Şekil 12**), 2'inde (%4.8) heterozigot (G/A) (**Şekil 13**) ve 12'sinde (%28.6) homozigot (A/A) (**Şekil 14**) oldukları saptandı. Grup 1 preterm bebeklerin alel sıklığı, 58 adet Guanin (%69.0) ve 26 adet Adenin (%31.0) haplotipi olarak belirlenmiştir. Grup 2'i oluşturan 50 prematüre bebekten 13'ünde (%26.0) polimorfizm saptanırken, 37'sinde (%74.0) polimorfizm saptanmamıştır. Grup 2 prematüre bebeklerin 37'sinde (%74.0) yabanıl (G/G), 4'ünde (%8.0) heterozigot (G/A) ve 9'unda (%18.0) homozigot (A/A) genotipe sahip oldukları saptandı. Grup 2 preterm bebeklerin alel sıklığı, 78 adet Guanin (%78.0) ve 22 adet Adenin (%24.0) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31 prematüre bebekten 6'sında (%19.4) polimorfizm saptanırken, 25'inde (%80.6) polimorfizm saptanmamıştır (**Şekil 15**). Kontrol grubundaki bebeklerin 25'inde (%80.6) yabanıl (G/G) ve 6'sında (%19.4) homozigot (A/A) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol preterm bebeklerin alel sıklığı, 50 adet Guanin (%80.6) ve 12 adet Adenin (%19.4) haplotipi olarak belirlenmiştir (**Tablo 9**).

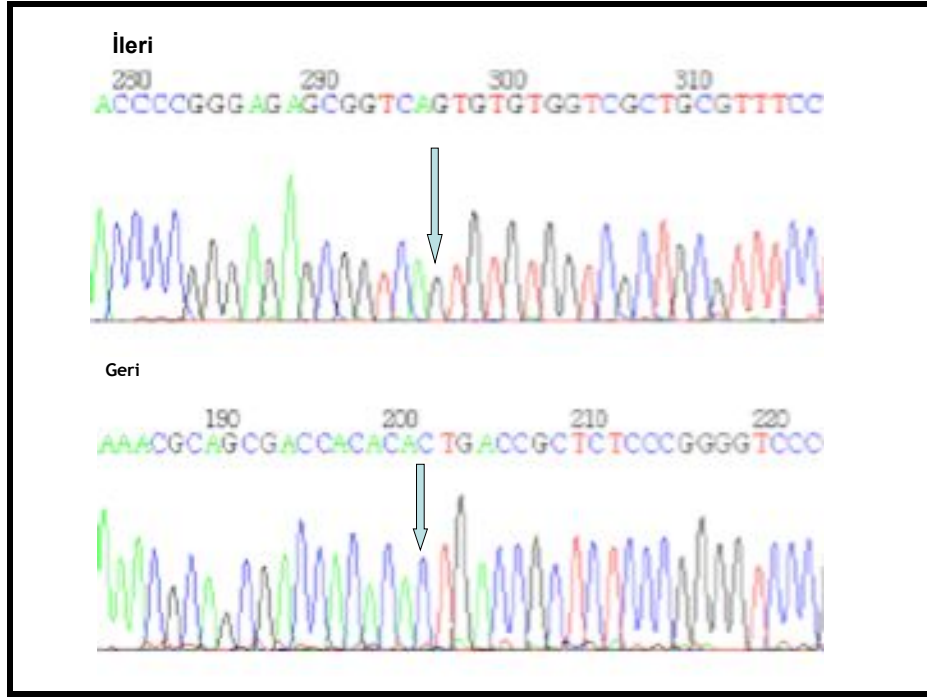
Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGFR+32 G→A polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.406$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.369$ ). Aynı gruplar, VEGFR+32 G/A haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.211$ ). VEGFR-2 promotor geninde %26.8 oranında VEGFR+32 G→A tek nükleotid polimorfizm varlığını saptadık. ROP gelişim riski ve progresyonu ile VEGFR-2 promotor gen polimorfizmi arasında ilişkinin zayıf olduğunu belirledik.

**Tablo 9. Üç grubun VEGFR+32 G > A genotip dağılımı ve alel sıklığı**

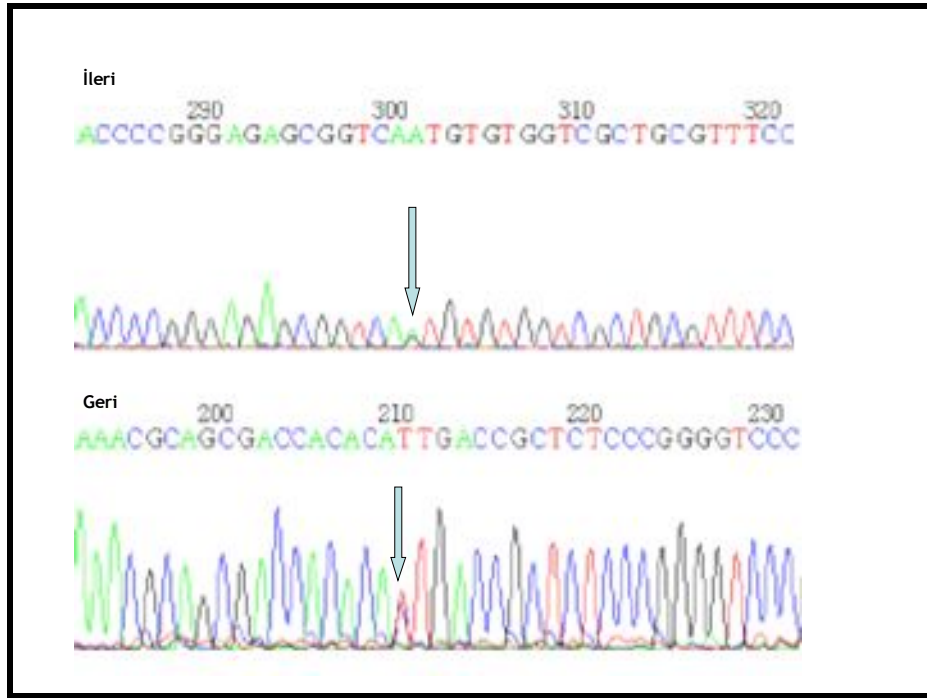
Polimorfizm	VEGFR+32 G > A		
	ROP (-)	Regrese ROP	Tedavi gerektiren ROP
A/A (%)	25 (80.6)	37 (74.0)	28 (66.7)
A/a (%)	-	4 (8.0)	2 (4.8)
a/a (%)	6 (19.4)	9 (18.0)	12 (28.6)
<i>P</i>		0.369	
Alel sıklığı			
A	0.806	0.780	0.690
a	0.194	0.240	0.310

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel

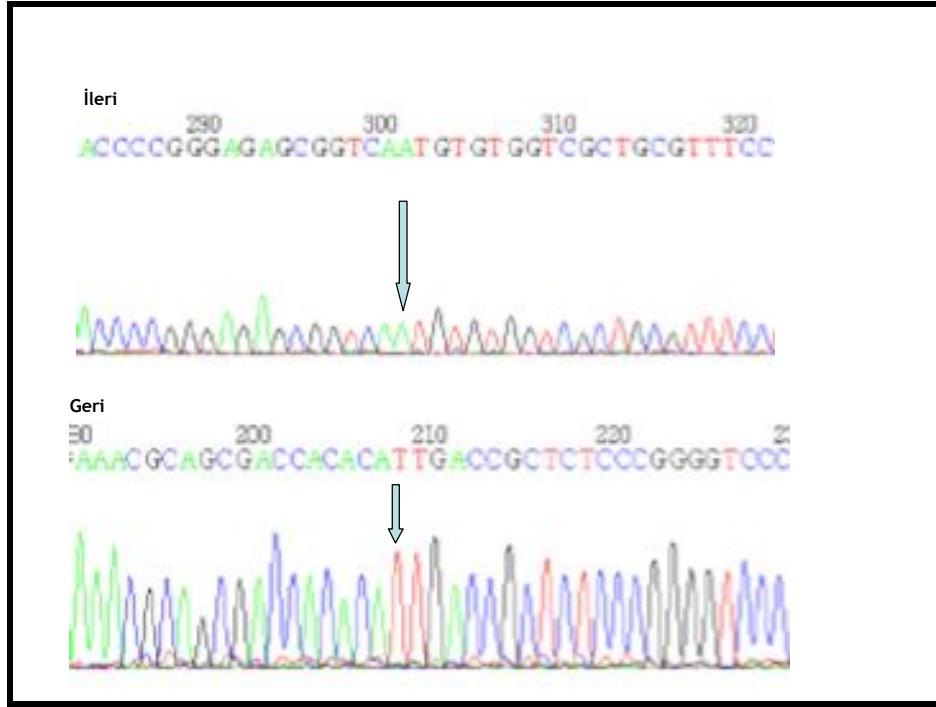


Şekil 12. 23 Nolu DNA örneğinde, polimorfizm noktasında VEGFR +32 yabancı G/G genotipi

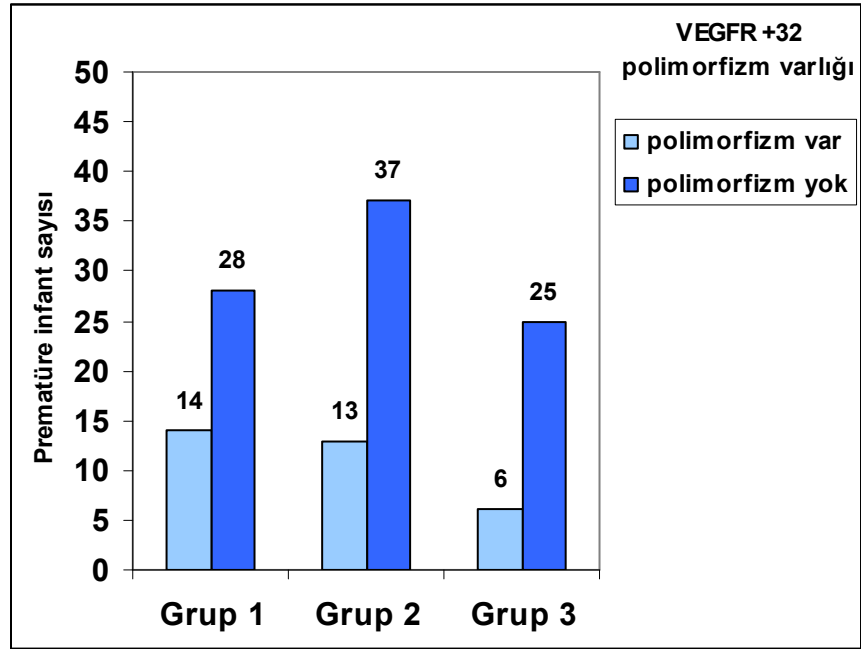


Şekil 13. 56 Nolu DNA örneğinde, VEGFR +32 heterozigot G/A genotipi





Şekil 14. 13 Nolu VEGFR +32 DNA örneğine ait homozigot A/A genotipi



Şekil 15. Gruplardaki VEGFR+32 polimorfizm varlığı

HGF promotor bölge polimorfizm analizinde, +17 ve -575 arasındaki 558 bp uzunluğundaki bölgenin DNA dizi analizi ile incelenmesi sonrasında 558 bp uzunluğundaki promotor bölgesinde ve c-Met promotor bölgesinin polimorfizm analizinde, -23 ve -477 arasındaki 454 bp uzunluğundaki promotor bölgesinde polimorfizm saptanmadı. HGF ve c-Met promotor gen bölgelerinin prematüre bebeklerde polimorfizm yönünden yüksek korunumlu olduğunu saptadık. HGF ve c-Met genleri anjiyogenezde önemli rol oynamalarına rağmen, hastalık gelişimi ve progresyonu ile ilişkili polimorfizm belirlenmedi.

ROP gelişen (Grup 1 ve Grup 2) ve ROP gelişmeyen (Grup 3) prematüre bebekler arasında yapılan VEGF-634 polimorfizm analizinde, ROP gelişen 92 prematüre bebekten 38' inde (% 41.3) polimorfizm saptanırken, 54' inde (%58.7) polimorfizm saptanmamıştır. ROP gelişen bebeklerin genotip dağılımı, 54'ünde (%58.7 yabanıl (G/G), 29' unda (%31.5) heterozigot (G/C) ve 9'unda (%9.8) homozigot (C/C) oldukları saptandı. ROP gelişen preterm bebeklerin alel sıklığı, 137 adet Guanin (%74.5) ve 47 adet Sitozin (%25.5) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31 prematüre bebekten 11'inde (%35.5) polimorfizm saptanırken, 20'sinde (%64.5) polimorfizm saptanmamıştır (**Şekil 16**). Kontrol grubundaki bebeklerin 20'sinde (%64.5) yabanıl (G/G), 8' inde (%25.8) heterozigot (G/C) ve 3'ünde (%9.7) homozigot (C/C) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol preterm bebeklerin alel sıklığı, 48 adet Guanin (%77.4) ve 14 adet Sitozin (%22.6) haplotipi olarak belirlenmiştir (**Tablo 10**).

Kontrol ve ROP gelişen (Grup 1 + Grup 2) prematüre bebeklerde VEGF-634 G→C polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.567$ , **OR:1.27**; **%95 CI: 0.55-2.97** ). İki grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.826$ ). Aynı gruplar, VEGF-634 G/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.713$ ).

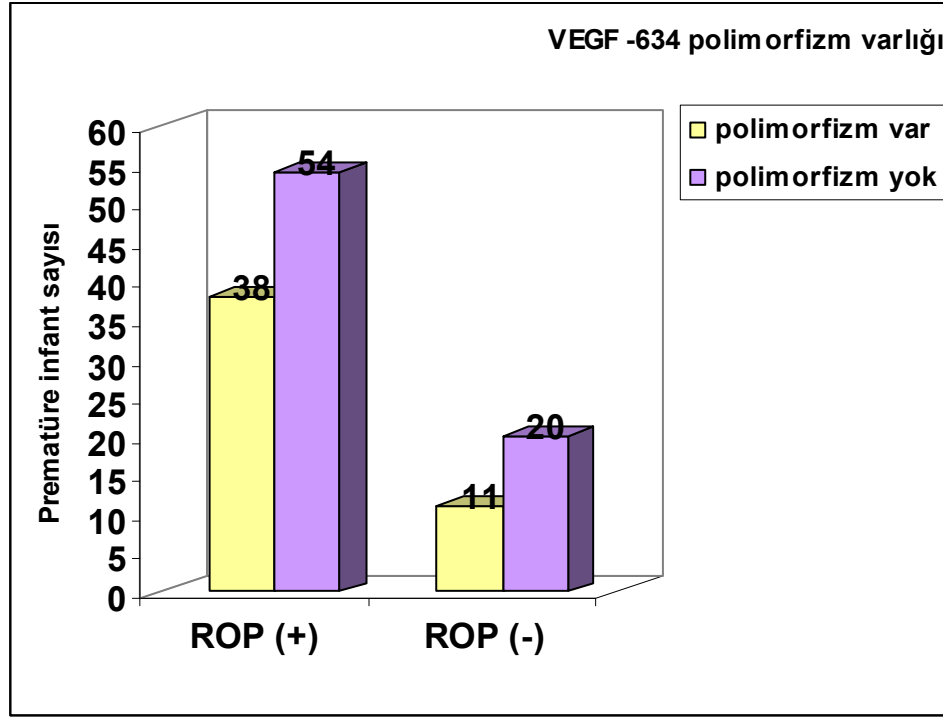
**Tablo 10. ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGF-634 G > C genotip dağılımı ve alel sıklığı**

Polimorfizm	VEGF-634 G > C	
	ROP (-)	ROP (+)
A/A (%)	20 (64.5)	54 (58.7)
A/a (%)	8 (25.8)	29 (31.5)
a/a (%)	3 (9.7)	9 (9.8)
<i>P</i>	0.826	
Alel sıklığı		
A	0.774	0.745
a	0.226	0.225
Odds ratio (%95 CI)	1.27 (0.70-2.32)	

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel

%95 CI: %95 güven aralığı



**Şekil 16. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGF-634 polimorfizm varlığı**

ROP gelişen (Grup 1 ve Grup 2) ve ROP gelişmeyen (Grup 3) prematüre bebekler arasında yapılan VEGF-460 polimorfizm analizinde, ROP gelişen 92 prematüre bebekin 54'ünde (%58.7) polimorfizm saptanırken, 38' inde (% 41.3) polimorfizm saptanmamıştır. ROP gelişen bebeklerin genotip dağılımı, 38'inde (%41.3) yabanıl (T/T), 38' inde (%41.3) heterozigot (T/C) ve 16'sında (%17.4) homozigot (C/C) oldukları saptandı. ROP gelişen preterm bebeklerin alel sıklığı, 114 adet Timin (%62.0) ve 70 adet Sitozin (%38.0) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31 prematüre bebekten 20'sinde (%64.5) polimorfizm saptanırken, 11'inde (%35.5) polimorfizm saptanmadı (**Şekil 17**). Kontrol grubundaki bebeklerin 11'inde (%35.5) yabanıl (T/T), 16' sında (%51.6) heterozigot (T/C) ve 4'ünde (%12.9) homozigot (C/C) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol preterm bebeklerin alel sıklığı, 38 adet Timin (%61.3) ve 24 adet Sitozin (%38.7) haplotipi olarak belirlendi (**Tablo 11**).

Kontrol ve ROP gelişen (Grup 1 + Grup 2) prematüre bebeklerde VEGF-460 T→C polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.567$ , OR: 0.78; %95: 0.33-1.81 ). İki grubun genotip analizi

açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.593$ ). Aynı gruplar, VEGF-460 T/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.418$ ).

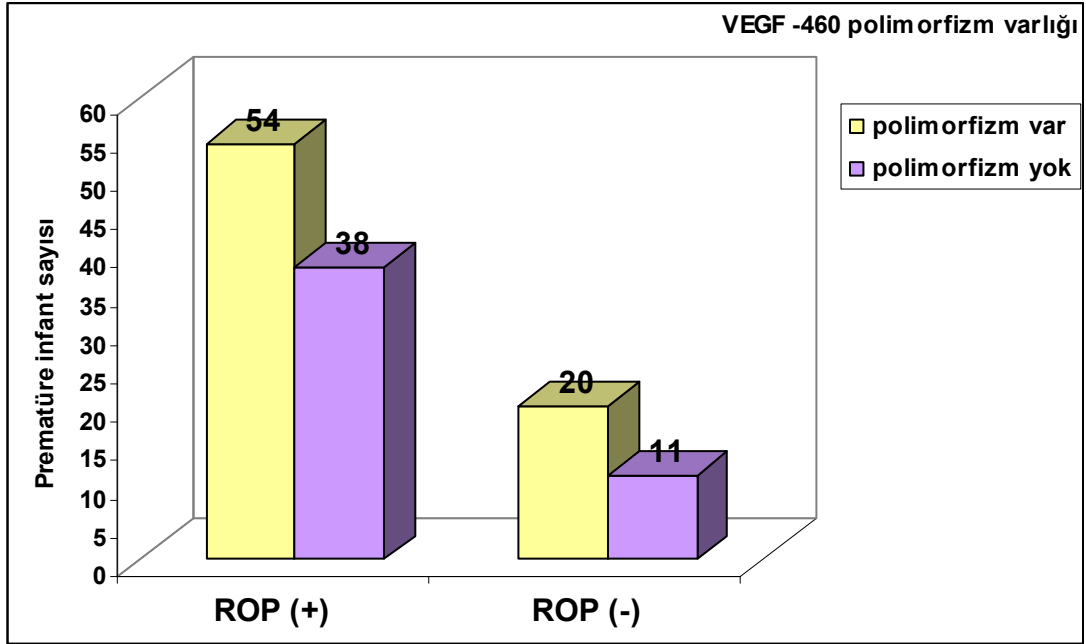
**Tablo 11. ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGF-460 T > C genotip dağılımı ve alel sıklığı**

Polimorfizm	VEGF-460 T > C	
	ROP (-)	ROP (+)
A/A (%)	11 (35.5)	38 (41.3)
A/a (%)	16 (51.6)	38 (41.3)
a/a (%)	4 (12.9)	16 (17.4)
<i>P</i>	0.593	
<b>Alel sıklığı</b>		
A	0.613	0.620
a	0.387	0.380
<b>Odds ratio (%95 CI)</b>	0.78 (0.43-1.42)	

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel

**%95 CI**: %95 güven aralığı



**Şekil 17. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGF-460 polimorfizm varlığı**

ROP gelişen (Grup 1 ve Grup 2) ve ROP gelişmeyen (Grup 3) prematüre bebekler arasında yapılan VEGFR+32 polimorfizm analizinde, ROP gelişen 92 prematüre bebeğin 27'sinde (%29.3) polimorfizm saptanırken, 65' inde (% 70.7) polimorfizm saptanmamıştır. ROP gelişen bebeklerin genotip dağılımı, 65'inde (%70.7) yabanıl (G/G), 6' sında (%6.5) heterozigot (G/A) ve 21'inde (%22.8) homozigot (A/A) oldukları saptandı. ROP gelişen preterm bebeklerin alel sıklığı, 136 adet Guanin (%73.9) ve 48 adet Adenin (%26.1) haplotipi olarak belirlenmiştir. Kontrol grubunu (Grup 3) oluşturan 31 prematüre bebekten 6'sında (%19.4) polimorfizm saptanırken, 25'inde (%80.6) polimorfizm saptanmamıştır (**Şekil 18**). Kontrol grubundaki bebeklerin 25'inde (%80.6) yabanıl (G/G) ve 6' sında (%19.4) homozigot (A/A) genotipe sahip oldukları saptandı. Kontrol preterm bebeklerin alel sıklığı, 50 adet Sitozin (%80.6) ve 12 adet Timin (%19.4) haplotipi olarak belirlenmiştir (**Tablo 12**).

Kontrol ve ROP gelişen (Grup 1 + Grup 2) prematüre bebeklerde VEGFR+32 G→A polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.277$ , OR: 1.73; %95: 0.63-4.69). İki grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

saptanmamıştır ( $p=0.291$ ). Aynı gruplar, VEGFR+32 G/A haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.172$ ).

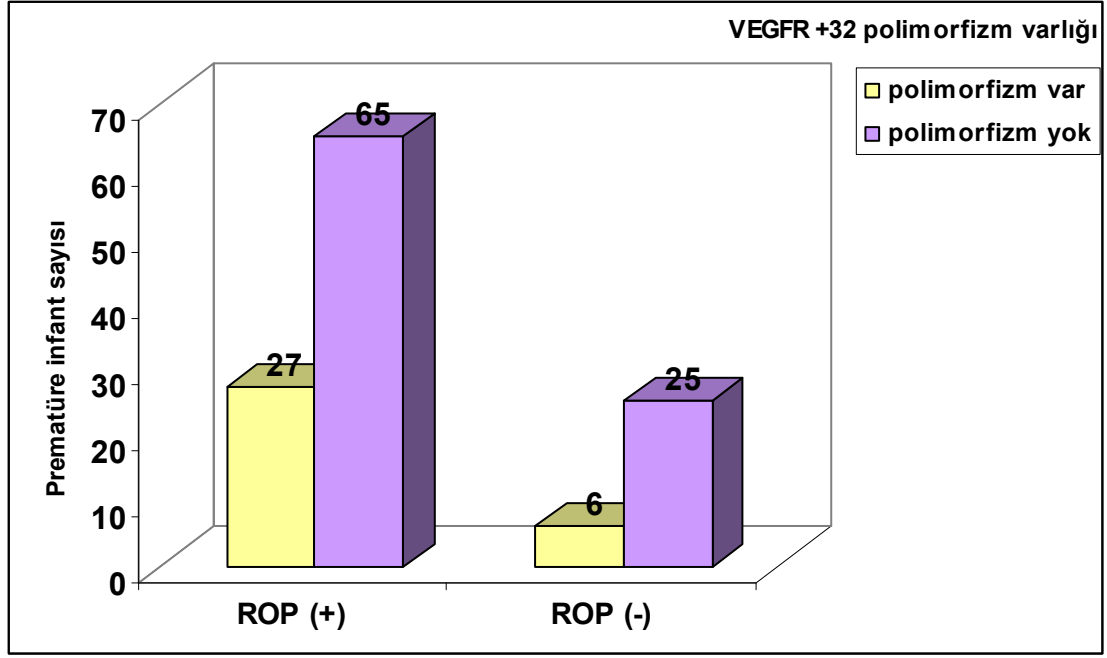
**Tablo 12. ROP (-) ve ROP (+) bebeklerin VEGFR+32 G > A genotip dağılımı ve alel sıklığı**

Polimorfizm	VEGFR+32 G > A	
	ROP (-)	ROP (+)
A/A (%)	25 (80.6)	65 (70.7)
A/a (%)	--	6 (6.5)
a/a (%)	6 (19.4)	21 (22.8)
<i>P</i>	0.291	
Alel sıklığı		
A	0.806	0.739
a	0.194	0.261
Odds ratio (%95 CI)	1.73 (0.85-3.50)	

*P*: Ki-kare testine göre üç grubun karşılaştırılması

A: Yaygın alel, a: nadir alel, A/A: homozigot yaygın alel, A/a: heterozigot, a/a: homozigot nadir alel

%95 CI: %95 güven aralığı



Şekil 18. ROP (+) ve ROP (-) bebeklerde VEGFR+32 polimorfizm varlığı



## **TARTIŞMA:**

Günümüzde ROP'u bilmemize ve tedavideki gelişmelere rağmen, hastalığın halen çocuklar arasında körlüğe yol açan en büyük nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir (85,86). Son zamanlarda yoğun bakım şartlarının iyileştirilmesi, düşük gestasyonel yaş ve çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin yaşamasına olanak sağlamakta ve bu gelişmeler ROP geliştirme riski çok yüksek bebeklerin artmasına neden olmaktadır. Geçmişte ROP gelişiminin oksijen kullanımına bağlı olduğuna inanılmaktaydı (47,48). Fakat, günümüz şartlarında kontrollü oksijen kullanımında bile ROP meydana geldiği bilinmektedir. Birçok faktör ROP riskini artırmaktadır. ROP gelişim riski özellikle, gestasyonel yaş ve çok düşük doğum ağırlığı ile güçlü ilişkilidir. Bizim çalışmamızda da ROP gelişimi ile gestasyonel yaş ve düşük doğum ağırlığı anlamlı olarak ilişkili bulundu. Diğer tanımlanan risk faktörleri arasında sepsis, intraventriküler hemoraji, ışığa maruz kalmak, kan transfüzyonu, mekanik ventilasyon gibi nedenler yer almaktadır (87). Tüm bunlara rağmen ROP'ta, neden düşük doğum ağırlıklı bazı bebeklerde zamanında müdahaleye rağmen şiddetli hastalığa ilerlerken, benzer klinik özelliklere sahip diğer bebeklerde hastalığın kendinden gerilediğinin anlaşılması güçtür. ROP gelişimi tek bir risk faktöre bağlı olmayıp, multifaktöriyel bir hastalıktır. Bu gelişmeler ışığında, ROP gelişiminde iyi bildiğimiz risk faktörleri dışında genetik faktörlerinde etkili olduğu söylenebilir.

ROP'un patogenezi üzerine genetik faktörlerin katkısının olabileceği hipotezi **Flynn** (72) tarafından 1990'ların başlarında açıklanmış ve etnik gruplar arasında çeşitli incelemelerle desteklenmiştir. ROP gelişim yatkınlığında, genetik temelin kanıtı olarak cinsiyet, etnik köken ve oküler pigmentasyonun etkilerini içeren bulgular gösterilmektedir (3). Birçok toplum kökenli çalışma, CRYO-ROP ve ETROP verilerine göre cinsiyet ve ROP gelişimi arasında bir ilişki olmadığını tanımlamışlardır (7,14,16,35). Yang ve ark.'ları (88) erkek cinsiyet ve şiddetli ROP arasında herhangi bir ilişki olmadığını göstermişlerdir. Buna karşın, Darlow ve ark.'ları (89) toplum kökenli prospektif çalışmalarında erkek cinsiyet ve şiddetli ROP arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda, prematüre olarak doğan bebeklerde erkek bebekler kız bebeklerden daha fazla bulundu. Fakat, cinsiyet ve şiddetli ROP arasında ilişki saptanamadı. Genel olarak, toplum kökenli büyük kohort preterm bebek çalışmalarında ROP insidansı üzerine cinsiyetin özellikle etkili olmadığı, fakat etkilenmiş bebeklerde hastalık şiddetiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. ROP insidansı farklı ırklar arasında çeşitlilik

göstermektedir (14,73). ROP gelişimi hem Amerika'da (14) hemde İngiltere'de (73) beyaz preterm bebeklerde siyahlardan daha sık saptanmış ve ROP insidansı erkek bebeklerde kız bebeklerden daha yüksek bulunmuştur. Irk'ın etkisi, gestasyonel yaş, doğum ağırlığı, genel sağlık durumu ve sosyoekonomik faktörlerden bağımsızdır (3). ROP yatkınlığında, farklı ırksal gruplar arasında oküler pigmentasyonun temel olabileceği vurgulanmaktadır. Tüm bunlar gerçekte ROP patogenezinde genetik faktörlerin önemli bir temel olabileceğinin göstergesidir (3).

Günümüzde yapılan çalışmalar, ileri evre ROP gelişim riski bulunan populasyonun erken tanınmasının önemini göstermektedir. Riskli olguların erken teşhisinin, erken tedaviyi beraberinde getireceğini ve prematüre bebeklerde kalıcı görme kaybı insidansının azaltılabileceği vurgulanmaktadır (14).

Son zamanlarda, anormal anjiyogenez ile seyreden spesifik hastalıklar ile özel genetik polimorfizmler ya da mutasyonlar arasındaki ilişkiye dikkat çekilmiştir. Birçok araştırmacı genetik polimorfizm ya da mutasyonların ROP gibi oküler hastalıklar üzerine olası etkilerini incelemişlerdir (3,90).

Norrie hastalığı (ND) ve X-bağlı ailevi eksüdatif vitreoretinopati (FEVR) genlerindeki mutasyonlar gibi diğer bazı genetik faktörlerde şiddetli ROP ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. ND ve FEVR, ROP benzeri birçok klinik bulgulara sahip gelişimsel retinal hastalıklardır (91). Bu retinal hastalıklar retina traksiyonu, retina dekolmanı ve fibrovasküler membran formasyonu ile kendini gösterirler. ND ve X-bağlı FEVR, ND gen mutasyonu gösterebilmektedir. ND genin Norrin üretimi gelişen retinal anjiyogenezde rol oynar. Norrin eksikliği olan ND gen mutant farelerde körlük geliştiği belirlenmiştir. ND gen mutasyonu retinal anjiyogenezde yetmezlik ve retinanın derin kapiller tabakalarında tam yoklukla kendini göstermiştir (91,92). Sharsty ve ark.'ları (93) yaptıkları çalışmalarında, 1500 gr dan daha az doğum ağırlığına sahip beyaz prematüre bebeklerde, ND genin 3. exon'unda iki mutasyon tanımlamışlardır. Bu çalışmada, genetik faktörlerin ROP gelişiminde rol oynayabileceğini gösteren ilk sonuçlar sadece sınırlı sayıda prematüre bebekte incelenmiştir. Sharsty ve ark.'ları bu mutasyonların eşik ROP gelişiminde rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Fakat, Haider ve ark.'ları (94) tarafından yapılan geniş populasyonlu preterm ROP'lu bebek çalışmalarında böyle bir ilişki gösterilmemiştir. Haider ve ark.'larının (95) 210 prematüre yenidoğan üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada, 115'i ROP gelişmeyen prematüre bebekler (kontrol grubu) ve 95'i

farklı evrelerde ROP geliştiren prematüre bebekler, ND gen 3. exon'unda 4 farklı polimorfizm göstermişlerdir.

Anjiyogenez oluşurken birçok olay basamaklar halinde birbirini izleyerek ortaya çıkmaktadır. İlk olarak anjiyogeneze neden olan bir uyarının oluşması (hipoksi, iskemi), daha sonra bu etkenden dolayı anjiyogenik bir faktörün salınması ve ilgili faktör ya da faktörlerin de bazal membranı parçalaması sözkonusudur (96). Anjiyogenezi uyaran birçok hormon ve/veya büyüme faktörleri mevcuttur (97). Düşük glukoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hipoksinin indüklediği transkripsiyon faktör-1 (HIF-1) aracılığı ile VEGF gibi büyüme faktörleri salınmaktadır (98). VEGF biyolojik aktivitesini, temel olarak endotel hücreleri tarafından salgılanan, yüksek afinite ile bağlandığı VEGFR-2 aracılığıyla yapmaktadır (99). HGF, anjiyogenezde önemli rol oynayan güçlü bir mitogenik, motogenik (hareketlilik sağlayıcı) ve morfogenez bir başka faktördür. HGF uyarımı, endotel hücrelerinde VEGF ve VEGFR gibi anjiyogenik faktörlerin salınımını artırmaktadır. HGF/c-Met sinyal ileti yolu anjiyogenez üzerine VEGF/VEGFR ile birlikte sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir (81).

VEGF, retina damarlarının normal gelişimi için önemli bir mediyatördür. ROP gelişiminde VEGF'in önemi birçok deneysel ve klinik verilerle desteklenmiştir. VEGF anjiyogenez için merkezi bir mediyatör olup, ROP patogenezinde anahtar rol aldığı bilinmektedir (25,27-28). Literatürde, ROP olgularında en çok çalışılan gen VEGF'dir. VEGF geni yüksek polimorfik bir genidir. VEGF'nin bilinen 70'ten fazla polimorfik bölgesi bulunmaktadır. Fakat, polimorfizmlerin çoğu ya nadir bulunmaktadır ya da fonksiyonel etkiye sahip değildir. ROP'un ilerlemesi, VEGF genin fonksiyonel polimorfizmi tarafından etkilenebildiği bildirilmiştir (71). VEGF promotor gen polimorfizminin VEGF proteinin farklı miktarlarda sentezlenmesi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (100). VEGF mRNA seviyesinin, şiddetli ROP' lu prematüre gözlerde avasküler retina sahasında artmış olduğu gösterilmiş, buna karşın lazer fotokoagülasyon uygulanan gözlerde mRNA seviyelerin azaldığı gösterilmiştir (101). Birçok çalışma VEGF'in tek nükleotid polimorfizmini tanımlamaktadır. Bu tek nükleotid polimorfizmi protein salınımında (ifadesinde) değişikliklerle ilişkili olup, eşik hastalığa ilerleme riskinde artışa neden olduğu saptanmıştır (3). Bizde çalışmamızda bu literatür verileri ışığında VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met gen polimorfizmlerinin ROP gelişimi ve ROP'taki iyileşme sürecinde etkili olabileceğini düşündük.

Sonuçlarımız, preterm bebeklerde şiddetli ROP gelişim riski ile VEGF G<sup>-634</sup>C ve VEGF T<sup>-460</sup>C tek nükleotid polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını gösterdi. VEGF ve ROP gelişimi arasındaki ilişki artan VEGF salınımı sonucudur. Hipoksinin uyardığı VEGF salınımının gen ifadesinin hangi düzeyinde olduğu bilgisine henüz sahip değiliz. Hipoksi uyarısı VEGF artışına mRNA ya da protein düzeyinde etki ediyor olabilir. Günümüzde yapılan VEGF promotor gen analizlerinin negatif sonuçları VEGF sentezi üzerine polimorfizm etkilerinin, ürün oluşumu sırasında meydana gelen etkilerden daha az olabileceğidir. Cooke ve ark.'ları (102) eşik ROP'lu 91 bebek ve 97 spontan gerileyen ve hastaliksız (ROP gelişmeyen) bebekle karşılaştırmalı yaptıkları çalışmalarında, VEGF G<sup>-634</sup>C tek nükleotid polimorfizmi taşıyan bebeklerin, eşik ROP için bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. G alel için homozigot olan bebeklerde VEGF salınımının daha yüksek olduğunu ve bu durumda eşik ROP gelişme olasılığının iki kat daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada, preterm bebeklerde eşik ROP'a ilerlemenin, VEGF salınımındaki genetik farklılıklar nedeniyle olabileceği vurgulanmıştır. Çalışmamızda ise gruplar arasında VEGF G<sup>-634</sup>C ve VEGF T<sup>-460</sup>C genotip dağılımı açısından istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamış, ROP gelişen ve ROP gelişmeyen hasta grubunda alel sıklığı benzer bulunmuştur. Vannay ve ark.'ları (103) çalışmalarında ≤ 1500 gr 86 eşik hastalıklı prematüre grubunda, ≤ 1500 gr 115 kontrol ROP (eşik hastalık olmayan ROP) grubundan VEGF G<sup>-634</sup>C prevalansının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada VEGF<sup>-460</sup>C alel prevalansını yönünden tedavi grubu ile tedavi olmayan ROP grubu arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı çalışmada VEGF<sup>-634</sup>C alel için heterozigot ve homozigot taşıyıcı durumun ROP için bağımsız bir risk faktörü olduğunu tanımlamışlardır. Bazı yazarlar VEGF G<sup>-634</sup>C polimorfizmin 5' yan zincirindeki diğer polimorfizmlerle farklı bağlantılarının olabileceğini düşünmektedirler (102,104) . Awata ve ark.'ları (104) diyabetik retinopati riskinin VEGF T<sup>-460</sup>C ve VEGF G<sup>-634</sup>C tek nükleotid polimorfizmin bazı haplotiplerle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada VEGF G<sup>-634</sup>C (VEGF<sup>+405</sup>C) alel için homozigot olan hastalarda VEGF serum seviyelerini diğer hastalara göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Kwinta ve ark.'ları (1) 128 prematüre bebekte (ortalama doğum ağırlığı 1054 gr ve gestasyonel yaş 28.1 hafta) yaptıkları çalışmalarında VEGF G<sup>+405</sup>C polimorfizm sıklığını ve sVEGF-R1 serum konsantrasyonlarının gruplar arasında benzer olduğunu belirlemişlerdir (ROP gelişmeyen grup, kendinden gerileyen ROP grubu ve tedavi

gerektiren ROP grubu). VEGF-460T polimorfik alel taşıyıcılığını tedavi gerektiren ROP grubunda, ROP gelişmeyen gruba göre önemli olarak yüksek bulmuşlardır. Çalışmada VEGF C<sup>460</sup>C alel taşıyıcılığı, TT ve TC alel taşıyan bebeklerden daha düşük bir riske sahip olduğu bulunmuştur. Shastry ve ark.'ları (105) Evre IV-V ROP'lu 61 olgu ile kontrol grubu olarak 61 term doğan bebeklerle karşılaştırmalı yaptıkları çalışmalarında VEGF promotor gen (VEGF G<sup>634</sup>C ve VEGFT<sup>460</sup>C) polimorfizm varlığını incelemiştir. Yaptıkları bu kohort çalışmalarında, ileri evre ROP hastalar ile term doğan bebekler arasında VEGF genin alel sıklığı açısından istatistiksel anlamlı farklılık olmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, ileri evre ROP riski ile VEGF promotor gen polimorfizm ilişkisi desteklenememiştir. Aynı çalışmada, gelecekte kliniklerde yüksek riskli bebeklerin tanımlanması için bu metodun kullanılması amacıyla, karışık etnik kökenli popülasyonu içeren geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır.

Önceki çalışmalarda, ROP gelişim riski ile VEGF +405 taşıyıcılığı ve fonksiyonel VEGF tek nükleotid polimorfizm arasında önemli bir korelasyon gösterilmiştir (103). Benzer olarak, VEGF C<sup>2578</sup>A polimorfizm de VEGF sentezini etkileyebileceği bildirilmiştir (2). Banyasz ve ark.'ları (2) anjiyogenik faktörlerden VEGF<sup>-2578</sup> ve Anjiopietin 2 (Ang 2)'nin ROP gelişimine katkıları üzeri yaptıkları çalışmalarında 200 preterm bebek incelenmiştir. 110 olgu tedavi edilmeyen gruba (28 olgu ROP gelişmeyen, 44 olgu Evre 1 ROP, 38 olgu Evre 2 ROP ) ve 90 preterm bebek ise tedavi edilen gruba oluşturmaktaydı. Çalışmada VEGF C<sup>2578</sup>A ve Ang G<sup>-35</sup>C genotip dağılımında ileri evre (Evre 4-5) ROP preterm bebekler ile ROP geliştirmeyen ve Evre 1-3 ROP grubu arasında anlamlı fark olmadığı bildirilmiştir. Fakat, VEGF<sup>-2578</sup> A alel prevalansı ileri evre ROP'lu preterm erkek bebeklerde, ROP geliştirmeyen ya da Evre 1-3 ROP preterm bebeklerden düşük bulunmuştur. Preterm kız bebeklerde, gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Aynı çalışmada, fonksiyonel VEGF tek nükleotid polimorfizmin, VEGF üretimi üzerine etkileri yoluyla ROP'un prevalansı ve şiddetini artırabileceği belirtilmiştir. Shahbazi ve ark.'ları (106) VEGF C<sup>2578</sup>A polimorfizmi periferik mononükleer kan hücrelerinde (PBMCs) VEGF üretimini değiştirebileceğini saptamışlardır. VEGF üretimindeki bu değişikliğin, VEGF<sup>-2578</sup>CC homozigot PBMC'in A alel için homozigot hücrelerden anlamlı derecede daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında, VEGF sentezi üzerine VEGF C<sup>2578</sup>A polimorfizm etkisinin, diğer bilinen polimorfizmlerden belirgin olarak daha az olabileceği vurgulanmaktadır.

Promotor, gen üzerinde temel transkripsiyon (yazılım) kompleksinin oluşturduğu bölgedir. Promotorlar, transkripsiyonun başlatılması için gerekli olan bölgeyi temsil ederler ve transkripsiyonun başladığı noktadan itibaren yukarıya doğru belirli bir alanda yer alırlar (107). Promotor bölgenin gen ifadesinde düzenleyici olduğu bilgisi göz önünde bulundurularak, çalışmamızda ROP patogenezinde önemli olduğunu düşündüğümüz VEGFR-2, HGF ve c-Met promotor gen bölgeleri DNA dizi analizi yöntemi ile tarandı.

Literatürde, ROP gelişimi ve şiddeti ile VEGFR-2 promotor gen polimorfizmi arasında yapılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada, literatürde ilk kez VEGFR-2 promotor geninde %26.8 oranında VEGFR G<sup>+32</sup>A tek nükleotid polimorfizm varlığını saptadık. Tedavi gerektiren ROP, kendiliğinden gerileyen ROP ve ROP geliştirmeyen preterm bebekler arasında VEGFR G<sup>+32</sup>A polimorfizm varlığı açısından ve VEGFR+32 alel sıklığı açısından istatistiksel anlamlı farklılık olmadığını gösterdik. ROP geliştiren ve geliştirmeyen bebekleri karşılaştırdığımızda benzer olarak, VEGFR G<sup>+32</sup>A polimorfizm varlığı açısından ve VEGFR+32 alel sıklığı açısından istatistiksel anlamlı fark saptamadık. Bu çalışmada, ileri evre ROP riski ile VEGFR-2 promotor gen polimorfizm ilişkisinin olmadığına yönelik veriler elde edildi.

Daha önce yapılan histopatolojik çalışmalarda, VEGF-A ve VEGFR-2'nin, ROP'lu deney hayvanlarının retina kan damarları, ganglion hücreleri ve iç nükleer tabakası ile ilişkili olduğu bulunmuştur. VEGFR-1'in ise ilişkisi olmadığı gösterilmiştir (108). İskemi bağımlı retinal neovaskülarizasyonlu hayvan modeli immünohistokimyasal bir çalışmada, benzer olarak VEGFR-2 immünreaktivitesinin avasküler alanda damar yakınlarında arttığı, buna karşın VEGFR-2 salınımının hipoksik retinada kontrol grubu ile benzer olduğu gösterilmiştir (109). VEGFR-2 salınımının, esas olarak patolojik neovaskülarizasyonla ilişkili olduğu, buna karşın fizyolojik doğum sonrası damar gelişimi ile ilişkisinin daha az olduğu bulunmuştur (110).

Retina gelişimi esnasında normal vaskülarizasyona katkıda bulunan faktörler patolojik neovaskülarizasyonu içeren moleküllerle benzerdir (80). Hem HGF hem de VEGF vaskülogenez ve anjiyogenezde rol alırlar. Fakat, HGF'un rolü daha az bilinmektedir. HGF, dağılım, proliferasyon ve migrasyonu içeren endotel ve epitelyal hücrelerde birçok hücresel cevabı içerebilir. HGF fonksiyonları endotel hücreleri ile sınırlı değildir. HGF endotel hücreleri ve perisitler arasında interaksiyonla vaskülarizasyonu direkt olarak etkileyebilmektedir (111).

Lashkari ve ark.'ları (83) Evre 4-5 ROP'lu gözlerde subretinal sıvıda VEGF ve HGF protein düzeylerini değerlendirmişlerdir. Kontrol grubu olarak primer, komplike olmayan regmatojen retina dekolmanlı hastaların subretinal sıvı örneklerini incelemişlerdir. VEGF ve HGF düzeylerinin ROP'lu gözlerde farklı olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada, aktif evre 4 ROP'lu hastalarda VEGF düzeylerinin çok yüksek olduğu, buna karşın HGF düzeylerinin çok düşük olduğunu bildirmişlerdir. HGF düzeyini sadece evre 5 ROP'ta yüksek belirlemişlerdir. Bu hastalığın (ROP) patofizyolojisinde bu molekülerin farklı rolleri olduğu düşünülmüştür. Aynı araştırmada evre 5 ROP'lu hastalarda retrolental membranda VEGFR-2 ve HGFR'un (c-Met) **in vivo** ekspresyonu incelenmiş, hem VEGFR-2 hem de HGFR proteinlerinin anjiyogenezde aktif olduğu retinal yüzey boyunca ve damar duvar membranlarında özellikle arka kısımda bulunduğu tanımlanmıştır. Bu bulgular ROP patogenezinde VEGF ve HGF'nin rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bilindiği gibi, HGF/c-Met sinyal ileti yolu anjiyogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır. ROP, birçok faktörün birlikte neden olduğu, anormal anjiyogenez sonucu meydana gelen bir hastalık kompleksidir. Bu veriler doğrultusunda çalışmamızda, daha önce çalışılmayan HGF ve c-Met promotor bölgesinde gen polimorfizmi olup olmadığı araştırıldı. Çalışmamızın temel amaçlarından biri olan HGF ve c-Met genlerinin polimorfizm varlığı ve ileri evre ROP, kendiliğinden gerileyen ROP ve ROP gelişmeyen prematüre olgular arasında ilişkinin olup-olmadığının belirlenmesi hedeflendi. HGF ve c-Met genlerinin minimal promotor bölgeleri dizileme yöntemi ile tamamen taranması sonrasında HGF ve c-Met genlerine ait herhangi bir polimorfizm varlığı saptanamamıştır. Bu bulgu HGF ve c-Met promotorlerinin çok yüksek korunumlu olduğunu ve polimorfik olmadığını göstermektedir.

Literatürde, ROP genetiği ile ilgili yapılan çalışmalar birbirleriyle çelişmektedir. Hatta aynı yazarların farklı zamanlarda yaptığı çalışmalarda bile çelişki görülmektedir (2,103). Yapılan tüm çalışmalar ROP gelişiminin tek bir faktöre bağlı olmadığını, aksine karmaşık bir süreç olduğunu ve gelecekte aydınlatılması gereken noktalar olduğunu destekler niteliktedir (1). ROP gelişiminin genetik kontrolüne yönelik ilgi gittikçe artmaktadır. Retina vaskülarizasyonun gelişimi genetik kontrol altındadır ve bu işleyişteki yukarıda belirtilen VEGF, VEGFR üretimindeki genetik polimorfizm [VEGF G<sup>+405</sup>C, VEGF T<sup>-460</sup>C ve VEGFR-2 G<sup>+32</sup>A] gibi herhangi bir eksiklik ROP gelişimi ile bağlantılı olabilir.

Genetik faktörler ile ROP arasındaki ilişki bilinen bir gerçektir. ROP patogenezi üzerine yıllardır yapılan araştırmalara rağmen, hangi bebeklerde ROP'un kendinden gerileyeceği ya da tedavi sonrasında bile gerilemeyeceği halen tam olarak bilinmemektedir. Yapılan insan ve hayvan çalışmaları genetik etkilerin ROP patogenezinde, hastalık progresyonun büyük bir kısmından sorumlu olabileceğini göstermektedirler. Birçok farklı hastalıkta anjiyogenez bağımlı süreçleri etkileyen genetik çeşitliliğin kanıtı son zamanlarda gözden geçirilmiştir. Anjiyogenez sürecindeki karmaşıklık göz önünde bulundurulduğunda, çok fazla sayıda genden herhangi birinin ekspresyonunda ya da düzenlenmesindeki değişiklikler ROP yatkınlığına genetiksel olarak katkıda bulunabilir (90).

Genetik yatkınlığı etkileyebilecek yeni polimorfizmlerin ya da mutasyonların tanımlanması önemli bir araştırma alanıdır. Sık aralıklı muayene ve tedavi ihtiyacı olan yüksek riskli ROP'ları belirlemek için aday genlerin taranması her bir preterm bebekte gelecekte mümkün olabilecektir. Bu gibi taramalar yüksek riskli bebeklerde görsel prognozu iyileştirmeli ve düşük riskli bebeklerde stresli muayene ihtiyacını ve gereksiz retinal fotokoagülasyon ilişkili morbiditeyi azaltmalıdır.

Bizim gözlemlerimiz ve daha önce yapılan çalışmalar ışığında, ROP gelişimi ve progresyonu ile VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met promotör gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin zayıf olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın, ROP ile ilişkili genetik faktörlerin, hastalık şiddeti ve tedavi gereksiniminin öngülmesinde aday genlerin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz. VEGF, VEGFR ve HGF/c-Met polimorfizm sinyal ileti yollarının ROP gelişiminde rol oynamadığını göstermemektedir.

Genetik polimorfizm, kodlanan veya kodlanmayan DNA dizilerinde meydana gelebilir. İntronlarda ve genler arasındaki DNA dizilerinde meydana gelen değişikliklerin genellikle hastalık üzerine etkisi yoktur. Ancak intron bölgelerindeki bazı polimorfizmlerin gen ekspresyonunu etkileyerek fenotipik değişiklikler meydana getirebileceği belirtilmektedir. Genlerin kodlanan bölgelerindeki (ekzon) polimorfizmler ise protein fonksiyonuna etki edebilir. Promotör bölgede meydana gelen polimorfizm ise transkripsiyon düzeyinde değişikliğe neden olabilir. Tek nükleotid polimorfizmi insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşitidir. Aminoasit değişimine neden olan tek nükleotid polimorfizmler, protein fonksiyonuna etki ederek fenotip üzerinde etki meydana getirebilir. Bazı gen polimorfizmleri



(aleller) bir hastalık riskini arttırırken bazıları azaltabilmekte (koruyucu alel), bazı polimorfik aleller ise yalnızca başka bir faktörün etkisi altındayken riski etkileyebilmektedir (112-113). Bir risk faktörü bir ya da daha fazla genin ifade edilmesini etkileyerek, ya da bir polimorfik gen ürünü bir çevresel faktörün etkisini değiştirerek ROP'a neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, ROP gelişiminde ve progresyonunda genlerin ve varyasyonlarının, gestasyonel yaş, düşük doğum ağırlığı, oksijen etkisi gibi diğer risk faktörleriyle birlikte etkisi, tek tek göstermiş oldukları etkinin toplamından daha fazla olabileceğidir. ROP gelişimi ya da ROP yatkınlıkla ilgili genlerin ve polimorfizmlerin bilinmesi, hiç şüphesiz ROP'un erken tanısı ve tedavisinde yararlı olabileceği kanısındayız. Ancak VEGF/VEGFR ve HGF/c-Met ekspresyonunu kontrol eden polimorfizmler dışında çok sayıda faktör bulunmaktadır. Bu nedenle gelecekte VEGF/VEGFR ve HGF/c-Met gen ekspresyonlarının analizine yönelik mRNA veya protein düzeyindeki analizler ile bu sinyal ileti yollarının ROP gelişimindeki rolü aydınlatılabilecektir.

## SONUCLAR

Bu çalışma Aralık 2006 ile Şubat 2009 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Oftalmoloji Birimi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Neonotoloji Birimi tarafından multidisipliner bir şekilde, prospektif çift kör olarak yapıldı. Çalışmaya Pediatrik Oftalmoloji Biriminde Prematürite nedeniyle takip edilen 123 olgu dahil edildi. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Etik Kurulu tarafından 7 Aralık 2006'de 2/2 protokol no ve 04/24/2006 sayı ile onaylandı. Helsinki Deklarasyonu Prensiplerine uygunluğu ise DEÜ Tıp Fakültesi Hastanesi etik kurulu tarafından onaylandı. Etik Kurul yönergelerine uyularak çalışmaya alınan tüm hastaların aileleri bilgilendirildi ve onamları alındı. Çalışmaya gestasyonel haftası  $\leq 34$  hafta olan prematüre doğan bebekler alındı. Aile öyküsünde Familial eksudatif vitreoretinopati (FEVR) varlığı, Norrie hastalığı veya akraba evliliği ve atipik ROP varlığı bulunan prematüre bebekler çalışma dışı bırakıldı.

123 prematüre bebeğin dağılımı; 42 (% 34.15) tedavi gerektiren ROP olguları (Grup 1), 50 (% 40.65) kendiliğinden gerileyen ROP olguları (Grup 2) ve 31 (% 25.2) herhangi bir ROP bulgusu olmayan prematüre olgular (Grup 3, kontrol grubu) şeklinde idi. Çalışmaya alınan tüm bebeklerin 55'i (% 44.7) kız ve 68'i (% 55.3) erkek idi. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p=0.568$ , **pearson Ki-kare testi**). Çalışmamızda, prematüre olarak doğan bebeklerde erkek cinsiyet kız cinsiyetten daha fazla bulundu. Fakat, cinsiyet ve şiddetli ROP arasında ilişki saptanmadı. Tüm prematüre bebeklerin gestasyonel yaşları 24 ile 34 hafta arasında değişmekte olup, ortalama  $29.6 \pm 2.4$  haftaydı. Doğum ağırlıkları ise 595 ile 2700 gr arasında olup, ortalama  $1289.2 \pm 354.8$  gr idi. Grup 1'teki bebeklerin ortalama gestasyonel yaşları Grup 2 ve Grup 3'teki prematüre bebeklere göre anlamlı derecede düşüktü. Doğumda ortalama gestasyonel yaş açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ( $p=0.0001$ ). Grup 1'deki bebeklerin ortalama doğum ağırlıkları da Grup 2 ve Grup 3'e göre anlamlı düşük saptandı. Fakat gruplar arasında ortalama doğum ağırlığı yönünden sadece Grup 1 ve Grup 3 arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır ( $p=0.001$ ). Grup 1 ve 2 ile Grup 2 ve 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Sırasıyla;  $P=0.62$ ,  $P=0.13$ ). ROP gelişim riski ve şiddeti ile düşük gestasyonel yaş ve düşük

doğum ağırlığı arasında korelasyon bulunmaktadır. Gestasyonel yaş ve doğum ağırlığı düştükçe ROP gelişim riski artmaktadır.

Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGF-634 G→C polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.840$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.604$ ). Aynı gruplar, VEGF-634 G/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.802$ ). VEGF promotor gen analiz sonuçlarına göre VEGF-634 G→C tek nükleotid polimorfizmin ROP gelişimi ve şiddeti üzerine önemli bir risk faktörü olmadığı gösterilmiştir.

Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGF-460 T→C polimorfizmi varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.840$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.890$ ). Aynı gruplar, VEGF-460 T/C haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.905$ ). VEGF-460 T→C tek nükleotid polimorfizm prevalansı tüm gruplarda yüksek bulunmuştur. Fakat, VEGF-460 T→C promotor gen polimorfizm varlığı ile ROP gelişim riski ve progresyonu arasında ilişki saptanmamıştır.

Kontrol ve çalışma gruplarını oluşturan prematüre bebeklerin VEGFR+32 G→A polimorfizm varlığı açısından karşılaştırıldıklarında, üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.406$ ). Üç grubun genotip analizi açısından karşılaştırılmalarında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.369$ ). Aynı gruplar, VEGFR+32 G/A haplotip analizi açısından karşılaştırıldıklarında da anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p=0.211$ ). VEGFR-2 promotor geninde %26.8 oranında VEGFR+32 G→A tek nükleotid polimorfizm varlığını saptadık. ROP gelişim riski ve progresyonu ile VEGFR-2 promotor gen polimorfizmi arasında ilişkinin zayıf olduğunu belirledik.

HGF promotor bölge polimorfizm analizinde, +17 ve -575 arasındaki 558 bp uzunluğundaki bölgenin DNA dizi analizi ile incelenmesi sonrasında 558 bp uzunluğundaki promotor bölgesinde ve c-Met promotor bölgesinin polimorfizm analizinde, -23 ve -477 arasındaki 454 bp uzunluğundaki promotor bölgesinde polimorfizm saptanmadı. HGF ve c-Met

promotor gen bölgelerinin prematüre bebeklerde polimorfizm yönünden yüksek korunumlu olduğunu saptadık. HGF ve c-Met genleri anjiyogenezde önemli rol oynamalarına rağmen, hastalık gelişimi ve progresyonu ile ilişkili polimorfizm belirlenmedi.

Sonuç olarak, bizim gözlemlerimiz ve daha önce yapılan çalışmalar ışığında, ROP gelişimi ve progresyonu ile VEGF, VEGFR, HGF ve c-Met promotor gen polimorfizmleri arasındaki ilişkinin zayıf olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın, ROP ile ilişkili genetik faktörlerin, hastalık şiddeti ve tedavi gereksiniminin öngülmesinde aday genlerin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

## **KAYNAKLAR**

1. **Kwinta P**, Bik-Multanowski M, Mitkowska Z, Tomasik T, Pietrzyk JJ. The clinical role of vascular endothelial growth factor (VEGF) system in the pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008; 246: 1467-1475
2. **Bányász I**, Bokodi G, Vannay A, Szebeni B, Treszl A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Szabó A. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2 in retinopathy of prematurity. *Curr Eye Res*. 2006; 31: 685-690.
3. **Holmström G**, van Wijngaarden P, Coster DJ, Williams KA. Genetic susceptibility to retinopathy of prematurity: the evidence from clinical and experimental animal studies. *Br J Ophthalmol*. 2007; 91: 1704-1708.
4. **Walker M**, Hull A. Preterm labor and birth. In: *Avery's Diseases of the Newborn*. 7th Ed. Avery GB, Toesch HW, Ballard RA (Eds). WB.Saunders Company, Philadelphia, 1998; 144-153.
5. **Thebaud B**, Watterberg K. Postnatal glucocorticoids in very preterm infants: The good, the bad and the ugly? *Pediatrics* 2001; 413-415.
6. **Yanovitch TL**, Siatkowski RM, McCaffree M, Corff KE. Retinopathy of prematurity in infants with birth weight  $\geq 1250$  grams-incidence, severity, and screening guideline cost-analysis. *J AAPOS* 2006; 10: 128-134.
7. **Shah VA**, Yeo CL, Ling YL, Ho LY. Incidence, risk factors of retinopathy of prematurity among very low birth weight infants in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 2005; 34: 169-178.
8. **Reynolds JD**, Dobson V, Quinn GE, et al. Evidence-based screening criteria for retinopathy of prematurity: natural history data from the CRYO-ROP and LIGHT-ROP studies. *Arch Ophthalmol* 2003; 120: 1470-1476.
9. **Terry TL**. Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. I. Preliminary report. *Am J Ophthalmol* 1942; 25: 203-204.
10. **Campbell K**. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia: a clinical approach. *Med J Aust* 1951; 2: 48-50.

11. **The Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity.** An international classification of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 1984;102: 1130-1134.
12. **Muñoz B**, West SK. Blindness and visual impairment in the Americas and the Caribbean. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 498-504.
13. **Kocur I**, Kuchynka P, Rodni S, Baráková D, Schwartz EC. Causes of severe visual impairment and blindness in children attending schools for the visually handicapped in the Czech Republic. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1149-1152.
14. **Palmer EA**, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 1991; 98: 1628-1640.
15. **Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** Results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial: revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 2003; 121: 1684-1696.
16. **Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** The incidence and course of retinopathy of prematurity: findings from the early treatment for retinopathy of prematurity study. *Pediatrics* 2005; 116: 15-23.
17. **Chow LC**, Wright KW, Sola A; CSMC Oxygen Administration Study Group. Can changes in clinical practice decrease the incidence of severe retinopathy of prematurity in very low birth weight infants? *Pediatrics* 2003; 111: 339–345.
18. **Rowlands E**, Ionides AC, Chinn S, Mackinnon H, Davey CC. Reduced incidence of retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 933-935.
19. **Larsson E**, Carle-Petrelus B, Cernerud G, Ots L, Wallin A, Holmstrom G. Incidence of ROP in two consecutive Swedish population based studies. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 1122-1126.
20. **Hardy P**, Dumont I, Bhattacharya M, Hou X, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Oxidants, nitric oxide and prostanoids in the developing ocular vasculature: a basis for ischemic retinopathy. *Cardiovasc Res.* 2000; 47: 489-509.
21. **Saint-Geniez M**, D'Amore PA. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol.* 2004; 48: 1045-1058.
22. **Rosenblatt BJ**, Benson WE. Retinopathy of prematurity. In *Ophthalmology*. Editors: Yanoff M, Duker JS. Mosby, St Louis 2004. p.879-888.

23. **Chemtob S**, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32: 1799-1807.
24. **Hardy P**, Nuyt AM, Abran D, St-Louis J, Varma DR, Chemtob S. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr Res.* 1996; 39: 487-493.
25. **Chen J**, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Anjiogen* 2007;10:133-140
26. **Chan-Ling T**, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 1201-1214.
27. **Smith LE**. IGF-I and retinopathy of prematurity in the preterm infant. *Biol Neonate* 2005; 88: 237-244.
28. **Hellström A**, Engström E, Hard AL, et al. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. *Pediatrics* 2003;112: 1016-1020.
29. **Fielder AR**, Posner EJ. Neonatal ophthalmology. In: Rennie JM (ed). *Robertson's Textbook of Neonatology*. London: Elsevier Churchill Livingstone; 2005: 835-850.
30. **Smith LE**. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 2004; 14: 140-144.
31. **The STOP-ROP Multicenter Study Group**. Supplemental therapeutic oxygen for prethreshold retinopathy of prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics* 2000; 105: 295-310.
32. **Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity**. The classification of retinal detachment. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 906-912.
33. **International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity**. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124: 1669-1670.
34. **Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group**. Multicentre trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity (preliminary results). *Arch Ophthalmol* 1988; 106: 471-479.

35. **Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** Multicentre trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Three month outcome. Arch Ophthalmol 1990; 108: 195-204.
36. **Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. 31/2 year outcome-structure and function. Arch Ophthalmol 1993; 111: 339-344.
37. **Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** Multicentre trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: ophthalmological outcome at 10 years. Arch Ophthalmol 2001; 119: 1110-1118.
38. **Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group.** Results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial: revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity. Arch Ophthalmol 2003; 121: 1684-1696.
39. **O’Keefe M,** Kirwan C. Screening for retinopathy of prematurity. Early Human Develop 2008;84:89-94.
40. **Section on Ophthalmology, American Academy of Pediatrics, American Academy of Ophthalmology American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus.** Screening examination of premature infants for retinopathy of prematurity. Pediatrics 2006;117:572–576.
41. **Jalali S,** Matalia J, Hussain A, Anand R. Modification of screening criteria for retinopathy of prematurity in India and other middle-income countries. Am J Ophthalmol 2006; 141: 966-968.
42. **Shaffer DB,** Palmer EA, Plotsky DF, et al. Prognostic factors in the natural course of retinopathy of prematurity. THA Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. Ophthalmology 1993; 100: 230-237.
43. **Mutlu FM,** Altınsoy Hİ, Mumcuoğlu T, et al. Frequency and risk factor analysis for retinopathy of prematurity: a multivariate statistical analysis. J Pediatr Ophthalmol Strabismus (accepted).
44. **Yaman A,** Berk AT, Kaynak S. Prematüre retinopatisi gelişimindeki risk faktörlerin gelişimi. MN Oftalmol 2005; 12: 45-48.



45. **Arroe M**, Peitersen B. Retinopathy of prematurity: review of a seven-year period in a Danish neonatal intensive care unit. *Acta Paediatr.* 1994; 83: 501-505.
46. **Akkoyun İ**, Oto S, Yilmaz G et al. Risk factors in the development of mild and severe retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2006; 10: 449-453.
47. **Askie LM**, Henderson-Smart DJ, Irwig L, Simpson JM. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med.* 2003; 349: 959-967.
48. **Kinsey VE**, Arnold HJ, Kalina RE, Stern L, Stahlman M, Odell G, Driscoll JM Jr, Elliott JH, Payne J, Patz A. PaO<sub>2</sub> levels and retrolental fibroplasia: a report of the cooperative study. *Pediatrics.* 1977; 60: 655-668.
49. **Vanderveen DK**, Mansfield TA, Eichenwald EC. Lower oxygen saturation alarm limits decrease the severity of retinopathy of prematurity. *J AAPOS.* 2006; 10: 445-448.
50. **McColm JR**, Geisen P, Hartnett ME. VEGF isoforms and their expression after a single episode of hypoxia or repeated fluctuations between hyperoxia and hypoxia: Relevance to clinical ROP. *Molecular Vision* 2004; 10: 512-520.
51. **Holmes JM**, Zhang S, Leske DA, Lanier WL. Carbon dioxide-induced retinopathy in the neonatal rat. *Curr Eye Res.* 1998; 17: 608-616.
52. **Shohat M**, Reisner SH, Krikler R, Nissenkorn I, Yassur Y, Ben-Sira I. Retinopathy of prematurity: incidence and risk factors. *Pediatrics* 1983; 72: 159-163.
53. **Lucey JF**, Dangman BA. Reexamination of the role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 1984;73:82-96.
54. **Christiansen SP**, Fray KJ, Spencer T. Ocular outcomes in low birth weight premature infants with intraventricular hemorrhage. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2002; 39: 157-165.
55. **Lin HJ**, Lin CC, Tsai SW, Lin HC, Su BH. Risk factors for retinopathy of prematurity in very low birth-weight infants. *J Chin Med Assoc.* 2003; 66: 662-668.
56. **Ambalavanan N**, Wu TJ, Tyson JE, Kennedy KA, Roane C, Carlo WA. A comparison of three vitamin A dosing regimens in extremely-low-birth-weight infants. *J Pediatr* 2003; 142: 656-661.

57. **Finer NN**, Schindler RF, Grant G, Hill GB, Peters K. Effect of intramuscular vitamin E on frequency and severity of retrolental fibroplasia. A controlled trial. *Lancet*. 1982; 1: 1087-1091.
58. **Englert JA**, Saunders RA, Purohit D, Hulsey TC, Ebeling M. The effect of anemia on retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. *J Perinatol*. 2001 ; 21: 21-26.
59. **Inder TE**, Clemett RS, Austin NC, Graham P, Darlow BA. High iron status in very low birth weight infants is associated with an increased risk of retinopathy of prematurity. *J Pediatr*. 1997; 131: 541-544.
60. **Phelps DL**, Watts JL. Early high reduction for preventing retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Cochrane Library*, Issue 2, 2002.
61. **Hussain N**, Clive J, Bhandari V. Current incidence of retinopathy of prematurity, 1989-1997. *Pediatrics*. 1999; 104:e26
62. **Repka MX**, Hardy RJ, Phelps DL, Summers CG. Surfactant prophylaxis and retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 1993; 111: 618-620.
63. **Higgins RD**, Mendelsohn AL, DeFeo MJ, Ucsel R, Hendricks-Munoz KD. Antenatal dexamethasone and decreased severity of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*. 1998; 116: 601-605.
64. **Sobel DB**, Philip AG. Prolonged dexamethasone therapy reduces the incidence of cryotherapy for retinopathy of prematurity in infants of less than 1 kilogram birth weight with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics*. 1992; 90: 529-533.
65. **Seiberth V**, Linderkamp O. Risk factors in retinopathy of prematurity. a multivariate statistical analysis. *Ophthalmologica*. 2000; 214: 131-135.
66. **Bardin C**, Rossignol M, Papageorgiou A. A retinopathy of prematurity and intrauterine growth retardation in infants <1000 gm. *Pediatr Res*. 1995; 37: 249.
67. **Mittal M**, Dhanireddy R, Higgins RD. Candida sepsis and association with retinopathy of prematurity. *Pediatrics*. 1998; 101: 654-657.

68. **Watts P**, Adams GG. In vitro fertilisation and stage 3 retinopathy of prematurity. *Eye*. 2000; 14: 330-333.
69. **Hammer ME**, Mullen PW, Ferguson JG, Pai S, Cosby C, Jackson KL. Logistic analysis of risk factors in acute retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol*. 1986; 102: 1-6
70. **Ben Sira I**, Nissenkorn I, Kremer I. Retinopathy of prematurity. *Surv Ophthalmol*. 1988; 33: 1-16.
71. **Csak K**, Szabo V, Szabo A, Vannay A. Pathogenesis and genetic basis for retinopathy of prematurity. *Front Biosci*. 2006; 11: 908-920.
72. **Flynn JT**. The premature retina: a model for the in vivo study of molecular genetics? *Eye* 1992; 6: 161-165.
73. **Ng YK**, Filder AR, Shaw DE, Levene MI. Epidemiology of retinopathy of prematurity. *Lancet* 1988; 2: 1235-1238.
74. **Distler O**, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 2002; 21: 33-49.
75. **Asahara T**, Bauters C, Zheng LP et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; 92: 365-371.
76. **Ferrara N**. Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1358-1366.
77. **Heidary G**, Vanderveen D, Smith LE. Retinopathy of prematurity: Current concepts in molecular pathogenesis. *Semin Ophthalmol* 2009; 24: 77-81.
78. **Shih SC**, Ju M, Liu N, Smith LE. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest*. 2003; 112: 27-29.
79. **Pieh C**, Agostini H, Buschbeck C, Krüger M, Schulte-Mönting J, Zirrgiebel U, Drevs J, Lagrèze WA. VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2 and Tie2 levels in plasma of premature infants: relationship to retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol*. 2008; 92: 689-693.
80. **Risau W**. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.

81. **You WK**, McDonald DM. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep.* 2008; 41: 833-839.
82. **Colombo ES**, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes retinal angiogenesis through increased urokinase expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 1793-800.
83. **Lashkari K**, Hirose T, Yazdany J, McMeel JW, Kazlauskas A, Rahimi N. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1337-1344.
84. **Sambrook J**, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: Laboratory manual* (3 volume set). December 1989.
85. **Haines JL**, Fielder A, Baker H, Wilkinson AR. UK population based study of severe retinopathy of prematurity: screening, treatment, and outcome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90: 240-244.
86. **Tompkins C**. A sudden rise in the prevalence of retinopathy of prematurity blindness? *Pediatrics* 2001; 108: 526-527.
87. **Karna P**, Muttineni J, Angell L, Karmaus W. Retinopathy of prematurity and risk factors: a prospective cohort study. *BMC* 2005; 5: 1-8.
88. **Yang MB**, Donovan EF, Wagge JR. Race, gender and clinical risk index for babies (CRIB) score as predictors of severe retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 2006; 10: 253–261.
89. **Darlow BA**, Hutchinson JL, Henderson-Smart DJ, et al. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics* 2005; 115: 990–996.
90. **Rogers MS**, D'Amato RJ. The effect of genetic diversity on angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006; 312: 561-574.
91. **Chen ZY**, Battinelli EM, Fielder A, Bunday S, Sims K, Breakefield XO, Craig IW. A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet.* 1993; 5: 180-183.
92. **Shastry BS**, Hejtmancik JF, Plager DA, Hartzler MK, Trese MT. Linkage and candidate gene analysis of X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Genomics.* 1995; 27: 341-344.

93. **Shastry BS**, Pendergast SD, Hartzler MK, Liu X, Trese MT. Identification of missense mutations in the Norrie disease gene associated with advanced retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115: 651-655.
94. **Haider MZ**, Devarajan LV, Al-Essa M, Srivastva BS, Kumar H, Azad R, Rashwan N. Retinopathy of prematurity: mutations in the Norrie disease gene and the risk of progression to advanced stages. *Pediatr Int.* 2001; 43: 120-123.
95. **Haider MZ**, Devarajan LV, Al-Essa M, Kumar H. A C597-->A polymorphism in the Norrie disease gene is associated with advanced retinopathy of prematurity in premature Kuwaiti infants. *J Biomed Sci.* 2002; 9: 365-370.
96. **Distler O**, Neidhart M, Gay RE, Gay S. The molecular of angiogenesis. *Intern Rev Immunol.* 2002; 21: 33-49.
97. **Hudlicka O**, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 1992; 72: 369-417.
98. **Folkman J**. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng Med.* 1971; 285: 1182-1186.
99. **Millauer B**, Witzmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993; 72: 835-846.
100. **Watson CJ**, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine.* 2000; 12: 1232-1235.
101. **Young TL**, Anthony DC, Pierce E, Foley E, Smith LE. Histopathology and vascular endothelial growth factor in untreated and diode laser-treated retinopathy of prematurity. *J AAPOS.* 1997; 1: 105-110.
102. **Cooke RW**, Drury JA, Mountford R, Clark D. Genetic polymorphisms and retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 1712-1715.

103. **Vannay A**, Dunai G, Bányász I, Szabó M, Vámos R, Treszl A, Hajdú J, Tulassay T, Vásárhelyi B. Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. *Pediatr Res.* 2005; 57: 396-398.
104. **Awata T**, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51: 1635-1639.
105. **Shastri BS**. Lack of association of VEGF (-2578 C-->A) and ANG 2 (-35 G-->C) gene polymorphisms with the progression of retinopathy of prematurity. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009; 247: 859-860.
106. **Shahbazi M**, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 260-264.
107. **Bélanger H**, Beaulieu P, Moreau C, Labuda D, Hudson TJ, Sinnott D. Functional promoter SNPs in cell cycle checkpoint genes. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2641-2648.
108. **Sarlos S**, Rizkalla B, Moravski CJ, Cao Z, Cooper ME, Wilkinson-Berka JL. Retinal angiogenesis is mediated by an interaction between the angiotensin type 2 receptor, VEGF, and angiopoietin. *Am J Pathol.* 2003; 163: 879-887.
109. **Suzuma K**, Takagi H, Otani A, Suzuma I, Honda Y. Increased expression of KDR/Flk-1 (VEGFR-2) in murine model of ischemia-induced retinal neovascularization. *Microvasc Res.* 1998; 56: 183-191.
110. **McLeod DS**, Taomoto M, Cao J, Zhu Z, Witte L, Luty GA. Localization of VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1) and effects of blocking it in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 474-482.
111. **Bhargava M**, Joseph A, Knesel J, Halaban R, Li Y, Pang S, Goldberg I, Setter E, Donovan MA, Zarnegar R, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor: activities, properties, and mechanism. *Cell Growth Differ.* 1992; 3: 11-20.

112. **Ekmekci A.** Gen, Genetik Değişim ve Hastalıklar, Gazi Kitabevi. Ankara, Türkiye, 1st ed., 2006; 217-245.
113. **Ekmekci A,** Konac E, Önen Hİ. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. Marmara Medical Journal 2008; 21: 282-295.
114. **Ma PC,** Tretrakova MS, Nallasura V, Jagadeeswaran R, Husain AN, Salgia R. Downstream signalling and specific inhibition of c-Met/HGF pathway in small cell lung cancer: implications for tumour invasion. Br J Cancer. 2007; 97: 368-377.

## CALIŖMAYA ALINAN PREMATÜRE İNFANTLARIN LİSTESİ

	<b>DNA NUMARASI</b>	<b>HASTA ADI SOYADI</b>	<b>PEDOF. NUMARASI</b>
1	1	B.G.	3061
2	2	L.B.	2787
3	3	A.B.	3033
4	4	Ü.P.	3132
5	5	H.Ç.	3131
6	6	A.Ç	3130
7	7	B.D.	3019
8	8	A.A.	3025
9	9	Ü.A.	3026
10	10	D.A.	3027
11	11	B.B.	2390
12	12	B.B.	2357
13	13	D.M.	3123
14	15	Ö.E.G.	2313
15	16	F.T.	3142
16	17	Y.E.A.	3020
17	18	B.Ö.	2715
18	19	F.A.	2447
19	20	B.K.	3013
20	21	A.A.D.	2862
21	22	D.B.	3173
22	23	Z.D.	3181
23	24	A.Ö.	2009
24	25	C.A.	2435
25	26	S.A.	3202
26	27	M.G.	821
27	28	B.K.	2212
28	29	E.E.	1003a
29	30	Y.S.C.	1898
30	31	A.Ü.	2499
31	32	B.S.	833
32	33	B.S	832
33	34	G.Ş.	2011
34	35	Y.Ş.	2007
35	36	U.H.A.	1892
36	37	E.E.	1003b
37	38	A.A.	2612
38	39	N.B.	3322
39	40	Y.M.D.	2491
40	41	B.K.	2847



	DNA NUMARASI	HASTA ADI SOYADI	PEDOF. NUMARASI
41	42	K.A.A.	2581
42	43	A.E.B.	3318
43	44	S.Ö.	3512
44	45	N.Ö.	2587
45	46	S.A.	3320
46	47	B.B.	2690
47	48	Y.E.V.	3208
48	49	E.D.G.	2824
49	50	E.B.	3528
50	51	E.B.	3529
51	52	Y.Ç.	3463
52	53	E.D.	3549
53	54	S.B.	893
54	55	Ö.B.	892
55	56	Y.B.Y.	2890
56	57	E.A.	3515
57	58	Z.T.	3531
58	59	E.A.D.	3490
59	60	A.Ç.	3793
60	61	F.Ç.	3792
61	62	C.O.S.	3886
62	63	S.E.G.	3885
63	64	G.N.D.	3775
64	65	U.P.E.	3881
65	66	B.A.	3743
66	67	M.A.Y.	3348
67	68	B.N.K.	2600
68	70	B.B.	3807
69	71	M.H.N.	3984
70	72	E.N.Ç.	3980
71	73	B.E.	3788
72	74	E.C.	3936
73	75	S.Y.	3982
74	76	T.O.	4019
75	77	U.A.	1724
76	79	F.T.G.	4114
77	81	O.G.	3397
78	83	B.G.	4131
79	84	İ.Ç.	3983
80	85	E.Ç.	4184
81	86	C.İ.	4208

	<b>DNA NUMARASI</b>	<b>HASTA ADI SOYADI</b>	<b>PEDOF. NUMARASI</b>
82	87	B.C.	3420
83	88	E.U.	4461
84	89	Ö.F.M.	4425
85	90	S.M.	4322
86	91	A.T.	4435
87	92	M.B.	4416
88	93	M.D.	4443
89	94	R.A.	2894
90	101	N.T.	4368
91	102	N.U.	4270
92	103	A.Y.	4168
93	104	E.Y.	4383
94	105	A.Y.	4382
95	106	G.K.	4451
96	107	E.Ş.	4458
97	108	B.A-II	4463
98	109	S.A.	4473
99	110	P.K.P	4396
100	111	B.B.	4365
101	112	U.D.E.	2403
102	113	R.K.	4457
103	114	R.C.Ş.	2850
104	115	İ.Ş.	4217
105	116	A.A.	4505
106	117	A.A.	4515
107	118	A.C.Y.	2340
108	119	M.Y.	2880
109	120	Ö.B.	3602
110	121	Z.B.	3596
111	122	P.A.	3494
112	123	B.A.	4542
113	124	Y.A.	4543
114	125	A.D.	4687
115	126	N.T.	4613
116	127	A.T.	4614
117	128	A.E.T.	4615
118	129	C.T.	4608
119	130	H.E.K.	3776
120	131	A.D.	4733
121	132	B.K.	2992

	<b>DNA NUMARASI</b>	<b>HASTA ADI SOYADI</b>	<b>PEDOF. NUMARASI</b>
<b>122</b>	<b>133</b>	<b>A.K.</b>	<b>3230</b>
<b>123</b>	<b>134</b>	<b>R.N.D.</b>	<b>4503</b>

## **EKLER**

### **EK-1**

#### **BsmFI RESTRIKSİYON ENZİMİ BİLGİLERİ**

##### **Recognition Site:**

5'...GGGAC(N)10'...3'  
3'...CCCTG(N)14'...3'

##### **Source:**

An E. coli strain that carries the cloned BsmFI gene from Bacillus stearothermophilus F (ER2683)

Reagents Supplied:

NEBuffer 4

BSA

##### **Enzyme Properties**

###### **Activity in NEBuffers:**

NEBuffer 1: 25%

NEBuffer 2: 50%

NEBuffer 3: 50%

NEBuffer 4: 100%

When using a buffer other than the optimal (supplied) NEBuffer, it may be necessary to add more enzyme to achieve complete digestion.

Methylation Sensitivity:

dam methylation: Not sensitive

dcm methylation: Blocked by overlapping

CpG methylation: Blocked by overlapping

More information about: Methylation Sensitivity

Activity at 37°C:

50%

Heat Inactivation:

80°C for 20 minutes

Survival in a Reaction:

(+ + +) Suitable for an extended or overnight digestion. Enzyme is active > 8 hours.

More information about: Extended Digests with Restriction Enzymes

Reaction & Storage Conditions

Reaction Conditions:

1X NEBuffer 4

Supplemented with 100 µg/ml Bovine Serum Albumin

Incubate at 65°C.

1X NEBuffer 4:

20 mM Tris-acetate

50 mM potassium acetate

10 mM Magnesium Acetate

1 mM Dithiothreitol

pH 7.9 @ 25°C

Unit Definition:

One unit is defined as the amount of enzyme required to digest 1 µg of pBR322 DNA in 1 hour at 65°C in a total reaction volume of 50 µl.

Concentration:

2,000 units/ml

Unit Assay Substrate:

pBR322 DNA

Storage Conditions:

10 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

1 mM Dithiothreitol

0.1 mM EDTA

200 µg/ml BSA

50% Glycerol

pH 7.4 @ 25°C

Storage Temperature:

-20°C

Diluent Compatibility:

Diluent A

**General notes:**

. BsmFI is an isoschizomer of FinI.

Occasionally, BsmFI has been shown to cleave the sequence GGGAC(9/13). □The exact frequency of this occurrence has yet to be determined.

**Quality Control for Current Lot**

Quality control values for a specific lot can be found on the datacard which accompanies each product.

**Ligation and Re-cutting:**

After a 5-fold overdigestion with BsmFI, > 95% of the DNA fragments can be ligated with T4 DNA Ligase (at a 5' termini concentration of 1-2 µM) at 16°C. Of these ligated fragments, > 95% can be recut with BsmFI.

**16-Hour Incubation:**

A 50 µl reaction containing 1 µg of pBR322 DNA and 5 units of BsmFI incubated for 16 hours at 65°C resulted in a DNA pattern free of detectable nuclease degradation as determined by agarose gel electrophoresis.

**Exonuclease Activity:**

Incubation of a 50 µl reaction containing 20 units of BsmFI with 1 µg of a mixture of single and double-stranded [3H] E. coli DNA (205 cpm/µg) for 4 hours at 65°C released < 0.1% of the total radioactivity.

**Endonuclease Activity:**

Incubation of a 50 µl reaction containing 10 units of BsmFI with 1 µg of pUC19 DNA for 4 hours at 37°C resulted in < 10% conversion to RFI as determined by agarose gel electrophoresis.

## EK-2

### VEGF MINIMAL PROMOTOR BÖLGE

LOCUS AF095785 3480 bp DNA linear PRI 29-MAY-2002

DEFINITION Homo sapiens vascular endothelial growth factor (VEGF) gene,  
promoter region and partial cds.

ACCESSION AF095785

VERSION AF095785.1 GI:4154290

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

**ORGANISM** Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 3480)

**AUTHORS** Brogan,I.J., Khan,N., Isaac,K., Hutchinson,J.A., Pravica,V. and  
Hutchinson,I.V.

**TITLE** Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human  
vascular endothelial growth factor gene

**JOURNAL** Hum. Immunol. 60 (12), 1245-1249 (1999)

**PUBMED** 10626738

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 3480)

**AUTHORS** Isaac,K., Brogan,I.J., Pravica,V. and Hutchinson,I.V.

**TITLE** Direct Submission

**JOURNAL** Submitted (30-SEP-1998) CID School of Biological Sciences,  
University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..3480  
/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:9606"  
/chromosome="6"  
/map="6p21.3"  
gene 1..>3480  
/gene="VEGF"  
promoter 1..2362  
/gene="VEGF"  
variation 823  
/gene="VEGF"  
/replace="c"  
variation 1946  
/gene="VEGF"  
/replace="t"

mRNA 2363..>3466  
 /gene="VEGF"  
 CDS 3401..>3466  
 /gene="VEGF"  
 /codon\_start=1  
 /product="vascular endothelial growth factor"  
 /protein\_id="AAD04918.1"  
 /db\_xref="GI:4154291"  
 /translation="MNFLLSVHWSLALLLYLHAK"

## ORIGIN

1 gaattctgtg cctcactcc ctggatecc tgggcaaagc ccagagggga aacacaaaca  
 61 ggttgttgta acacaccttg ctgggtacca ceatggagga cagttggctt atgggggtgg  
 121 ggggtgctg gggccacgga gtgactgtg atggetatcc ctcttgga cccctccage  
 181 ctctcttag ctccagattt gtttattgt ttttactaa gacctgctct ttcaggtctg  
 241 ttggctttt taggggetga agaagccga gttgagaagg gatgcaaggg agggggccag  
 301 aatgagcct tagggctcag agcctccate ctgcccag atgtctacag cttgtctcc  
 361 tggggtgcta gaggcgcaca aggaggaaag ttagtggctt ccttccata tccgttcat  
 421 cagctagag catggagccc aggtgaggag gctgctgg gagggggccc tgagccagga  
 481 aataaacatt factaactgt acaagacct tgcctgct gctggggagc ctgccaagtg  
 541 gtggagacag gactagtga cgaatgatgg aaagggaggg ttggggtggg tgggagccag  
 601 ccttttct cataagggcc ttaggacacc ataccgatgg aactgggggt actggggagg  
 661 taacctaga cctcaccaa accacagca catgtgctga ggatggggct gactaggtaa  
 721 gctccctgga gcttttgg taaattgagg gaaattgctg cattccatt ctgctccat  
 781 gctccacag aggetatgcc agctgtagge cagacctgg caagatctgg gtggataatc  
 841 agactgactg gctcagage cccaacttg ttcctgggg cagctggaa atagccaggt  
 901 cagaaccag ccaggaattt ttccaagctg ctctatat gcaagaatgg gatggggccc  
 961 tttgggagca ctagggaag atgtggagag ttggaggaaa agggggcttg gaggtaaggg  
 1021 aggggactgg ggggaaggata ggggagaagc tgtgagcctg gagaagtage caagggatec  
 1081 tgagggatg ggggagctga gacgaaacce ccattctat tcagaagatg agctatgagt  
 1141 ctgggcttg gctgataga gcttggecc ctggctggg gggagctctg ggcagctggc  
 1201 ctacagactg tcttagtgc tggcgggtag gttgaaatc tcacgcagge cctggctcc  
 1261 accgcccc accagecccc tggctcagt tccctggca catctggggg tgggggggca  
 1321 gcaggaacaa gggcctctgt ctgcccagct gctccccct ttgggtttg ccagactcca  
 1381 cagtgcatac gtgggtcca acaggtctc tccctccca gtcactgact aacccggaa  
 1441 ccacacagct tccgttctc agctccaca acttgggtgc aaattctct cccctgggaa  
 1501 gcaacctgg aacttcca aaggaccca gtcactccag cctgttggct gccgtcact  
 1561 ttgatgtctg caggccagat gagggtcca gatggccat tgcagaggg acacactgtg  
 1621 gccctgtgc ccagcctgg gctctctga catgaagca ctcagctcc aatatgtag  
 1681 ctgtttggga ggtcagaaat aggggtcca ggagcaaact cccccacc ctttccaa  
 1741 gccattccc tcttagcca gagcgggggt gtgcagacgg cagtcactag ggggcctcg  
 1801 gccaccacag ggaagctggg tgaatggagc gagcagctc ttcagagtg aggacgtgtg  
 1861 tctctgtg ggtgagtgag tgtgtgctg tggggtgag ggtgtggag cggggagaag  
 1921 gccaggggtc actccagat tcaacagat ctgtgtgccc ctctcccc cgtcctctg  
 1981 ccgctctcc gcttcccc gcccttca atattctag caagagggga acgctctca

2041 ggcctgtcc gcaagtaacc tcaacttctc gctccctcct egccaatgcc cegeggtcgc  
 2101 gtgtctctgg acagagtttc cgggggcgga tgggtaattt tcaggctgtg aaccttggtg  
 2161 ggggtcagc tteccctca ttgcggcggg ctgcgggcca ggetteactg ggcgtccgca  
 2221 gageccgggc cegagecgeg tgtggagggg ctgaggetcg cctgtccccg cccccgggg  
 2281 cgggcggggg gcggggtccc ggcggggcgg agccatgcgc cccccctt ttttttaa  
 2341 agtcgctgg tagcggggag gatcggggag gcttggggca gccgggtagc tggaggtcg  
 2401 tggectggg ggctagcacc agcgtctgt cgggagcgc ageggttagg tggaccggtc  
 2461 ageggactca cggccaggg cgtcgggtgc tggaattga tattcattga tccgggtttt  
 2521 atccctctt tttttctta aacattttt tttaaactg tattgtttc cgttttaatt  
 2581 ttttttctg tgccatccc cactgaate ggcgcagcg cttggggaga ttctctact  
 2641 tcccataatc actgtggatt ttgaaacca gcagaaagag gaaagagga gcaagagctc  
 2701 cagagagaag tcgaggaaga gagagacggg gtcagagaga gcgcggggc gtgcgagcag  
 2761 cgaagcgcac aggggcaag tgagtacct gctttgggg gtgaccgccc gagecgggg  
 2821 tgaccctcc ccttgggat cccgcagctg accagtcgc ctgacggaca gacagacaga  
 2881 caccgcccc agcccagct accactctc ccccggcggg cggcggacag tggaccgccc  
 2941 ggcgagcgc gggcaggggc cggagcccgc gcccgaggc ggggtggagg ggtcggggc  
 3001 tegeggtc gactgaaac tttctcca acttctggg tgttctcct tcggaggagc  
 3061 cgtggtcgc ggggggaag cegagccgag cggagcgcg agaagtgcta gctcggggc  
 3121 ggaggagccg cagccggagg agggggagga ggaagaagag aaggaagagg agagggggcc  
 3181 gcagtggcga ctgcgctc ggaagccggg ctcattggag ggtgagggc cgggtgctgc  
 3241 agacagtct ccagcgcgc gcctcccca ggcctggcc cgggcctcgg gccggggagg  
 3301 aagagtact cgcgagggc cegaggagag cgggcgccc cacagcccga gccggagagg  
 3361 gagecgcgc gcgcggcc cggtegggc ctccgaaacc atgaacttc tctgtcttg  
 3421 ggtgcattgg agccttct tctgtctca ctccaccat gcaaggtaa gcggtcgtc

## VEGF PROMOTER BÖLGE (1.EKZON'UN TAMAMI)

LOCUS HUMVEGF1 3480 bp DNA linear PRI 03-AUG-1993

DEFINITION Human vascular endothelial growth factor gene, exon 1.

ACCESSION M63971

VERSION M63971.1 GI:340206

KEYWORDS vascular endothelial growth factor.

SEGMENT 1 of 8

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;

Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (sites)

AUTHORS Tischer,E., Mitchell,R., Hartman,T., Silva,M., Gospodarowicz,D.,  
Fiddes,J.C. and Abraham,J.A.

TITLE The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple  
protein forms are encoded through alternative exon splicing

JOURNAL J. Biol. Chem. 266 (18), 11947-11954 (1991)



PUBMED 1711045  
COMMENT Original source text: Homo sapiens lung DNA.

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..3480  
/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:9606"  
/cell\_type="fibroblast"  
/tissue\_type="lung"  
mRNA join(2363..3466,M63972.1:18..69,M63973.1:18..214,  
M63974.1:18..94,M63975.1:18..47,M63976.1:18..89,  
M63977.1:18..149,M63978.1:18..76)  
/product="vascular endothelial growth factor"  
exon 2363..3466  
/product="vascular endothelial growth factor"  
/number=1  
CDS join(3401..3466,M63972.1:18..69,M63973.1:18..214,  
M63974.1:18..94,M63975.1:18..47,M63976.1:18..89,  
M63977.1:18..149,M63978.1:18..39)  
/codon\_start=1  
/product="vascular endothelial growth factor"  
/protein\_id="AAA36804.1"  
/db\_xref="GI:340215"

/translation="MNFLLSWVHWSLALLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFM  
DVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNI  
TMQIMRIKPHQGQHIGEMSFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKKGQKRKRKKSRY  
KSWSVPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR"

**ORIGIN**

1 gaattctgtg cctcactcc cctggatccc tgggcaaage ccagagggga aacacaaca  
61 ggttgtgtga acacacctg ctgggtacca ccatggagga cagttggctt atgggggtgg  
121 ggggtgctg gggccacgga gtgactggtg atggetatcc ctcttggaa ccctccagc  
181 ctectcttag cttcagattt gtttatttgt ttttactaa gacctgctct ttcaggtctg  
241 ttggtctttt taggggtga agaaggcca gttgagaagg gatgcaaggg agggggccag  
301 aatgagcct tagggetcag agcctccate ctgeccaag atgtctacag cttgtgetcc  
361 tggggtgcta gaggcgcaca aggaggaaag ttagtggctt ccttccata tcecttcat  
421 cagcctagag catggagccc aggtgaggag gctgctctgg gagggggccc tgagccagga  
481 aataaacatt tactaactgt acaagacct tgctctget getggggagc ctgccaagt  
541 gtggagacag gactagtgca cgaatgatgg aaaggagggg tgggggtggg tgggagccag  
601 cccttttct cataagggcc ttaggacacc ataccgatgg aactgggggt actggggagg

661 taacctagca cctccacca accacagcaa catgtgctga ggatgggct gactaggtaa  
721 gctccctgga gcgttttgg taaattgagg gaaattgctg cattccatt ctcagtccat  
781 gctccacag aggetatgce agctgtagge cagacctgg cagatctgg gtggataate  
841 agactgactg gctcagage cccaacttg tccctgggg cagctggaa atagccaggt  
901 cagaaaccag ccaggaattt ttcaagctg ctcctatat gcaagaatgg gatggggcc  
961 tttgggagca cttaggaag atgtggagag ttggaggaaa aggggcttg gaggaaggg  
1021 aggggactgg ggggaaggata ggggagaagc tgtgagctg gagaagtagc caagggatec  
1081 tgagggaatg ggggagctga gacgaaacce ccatttetat tcagaagatg agctatgagt  
1141 ctgggcttg gctgatagaa gcctggccc ctggctggg gggagctctg ggcagctggc  
1201 ctacagactg tcttagtgc tggcgggtag gttgaaatca tcacgagge cctggctec  
1261 accegeccc accageccc tggctcagt tccctggcaa catctggggg tgggggggc  
1321 gcaggaacaa gggcctctg ctgcccagt gctccccc tggggttg ccagactca  
1381 cagtgcatac gtggcteca acaggctct tccctcca gtcactgact aaceccgaa  
1441 ccacagct tcccgtctc agctccaca acttggtgce aaattctt cccctgggaa  
1501 gctcctgg accttcca aaggacceca gtcactccag cctgttggt gccctcact  
1561 ttgatgtctg caggccagat gaggctcca gatggcaat tgcagaggg acacactgtg  
1621 gccctgtgc ccagcctgg gctctctga catgaagcaa ctcagtecc aatatgtag  
1681 ctgtttggga ggtcagaaat agggggtcca ggagcaact cccccccc ctttccaaa  
1741 gccattccc tcttagcca gagccgggtg tgcagaggg cagtcactag ggggctctg  
1801 gccaccag ggaagctggg tgaatggage gacagctc ttcagagtg aggagctgtg  
1861 tctctgtg ggtgagtgag tgtgtgctg tggggtgag ggtgttgag cggggagaag  
1921 gccaggggtc actccaggat tcaatagat ctgtgtgtec ctctcccac ccgtccctg  
1981 ccgctctcc gcttccc tccccctca atattctag caaagagga acgctctca  
2041 ggcctgtcc gcagtaacc tcaattctc gctcctct ccgcaatgce ccggggccc  
2101 gtgtctctg acagagttc cggggggcga tgggtaatt tcaggctgtg aacttggtg  
2161 ggggtgagc tccccctca ttgcccggg ctgcccga ggttctctg ggcctcga  
2221 gageccgggc ccgagccgc tgtggaggg ctgagctgc cctgtccc cccccggg  
2281 cgggcccggg gcggggtccc ggcggggcgg agccatgccc cccccctt ttttttaa  
2341 agtcggctgg tagcggggag gatcggggg gcttggggc gccgggtagc tcggaggtc  
2401 tggcctggg gcttagcacc agcctctgt cgggagccc agcggtagg tggaccggtc  
2461 agcggacta ccggccagg cctcgggtc tggaaattga tattattga tccgggtt  
2521 atccctctc tttttctt aacattttt ttaaaactg tattgttct cgttttaatt  
2581 tattttctg tccattccc caattgaate gggccagcc cttggggaga ttctctact  
2641 tccccaaate actgtggatt ttgaaacca gcagaaagag gaaagagga gcaagagctc  
2701 cagagagaag tcgaggaaga gagagacggg gtcagagaga gcgcgcccgtc gtcgagcag  
2761 cgaagccgac aggggcaag tgagtgaact gctttgggg gtgaccgccc gagecggcg  
2821 tgagccctcc ccttgggat cccagctg accagtcgc ctgacggaca gacagacaga  
2881 caccgcccc agcccagct accactct ccccgccc cggcggacag tggaccgccc  
2941 ggcgagccc gggcaggggc cggagccc gcccggagg ggggtggagg ggtcggggc  
3001 tcgcccgtc gactgaaac tttctgcca acttctgggc tttctctc tcggaggagc  
3061 cgtgtccc gcgggggaag ccgagccgag cggagcccg agaagtgcta gctcggccc  
3121 ggaggagccc cagccggagg agggggagga ggaagaagag aaggaagagg agagggggc  
3181 gcagtggcga ctgcccctc ggaagccc ctcattggag ggtgagccc cgtgtgccc  
3241 agacagtct ccagcccgc gcctcccca ggcctggcc cgggctcgg gccggggagg  
3301 aagagtact ccgagggc ccgaggagag cggcccgc cacagcccga gccggagagg

3361 gagecgagc egecgggc cggteggc ctcgaaacc atgaacttc tgctgtcttg  
3421 ggtgcattgg agccttgcct tgctgtctta cctccaccat gccaggtaa gcggtcgtgc

### EK-3

#### VEGFR (FLK1) MINIMAL PROMOTOR BÖLGE

LOCUS X89776 1267 bp DNA linear PRI 14-JAN-1996

DEFINITION H.sapiens DNA for 5'UTR of receptor tyrosine.

ACCESSION X89776

VERSION X89776.1 GI:1155008

KEYWORDS KDR/flk-1 gene.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;

Catarrhini; Hominidae; Homo.

#### REFERENCE 1

AUTHORS Patterson,C., Perrella,M.A., Hsieh,C.M., Yoshizumi,M., Lee,M.E. and Haber,E.

TITLE Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor

JOURNAL J. Biol. Chem. 270 (39), 23111-23118 (1995)

PUBMED 7559454

#### REFERENCE 2

AUTHORS Patterson,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (19-JUL-1995) C. Patterson, Harvard School of Public Health, Cardiovascular Biology Lab, 677 Huntington Avenue, Building 2 Room 113a, Boston MA 02115, USA

REMARK Revised by [2]

#### REFERENCE 3 (bases 1 to 1267)

AUTHORS Patterson,C.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JAN-1996) C. Patterson, Harvard School of Public Health, Cardiovascular Biology Lab, 677 Huntington Avenue, Building 2 Room 113a, Boston MA 02115, USA

COMMENT On Jan 15, 1996 this sequence version replaced gi:1019387.

#### FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1267  
/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:9606"  
gene 1..>1150  
/gene="KDR/flk-1"  
promoter 1..881  
/gene="KDR/flk-1"  
CDS 1084..>1150

/gene="KDR/flk-1"  
/codon\_start=1  
/product="vascular endothelial growth factor (VEGF)  
receptor"  
/protein\_id="CAA61916.1"  
/db\_xref="GI:1155009"  
/db\_xref="GDB:127921"  
/db\_xref="GOA:P35968"  
/db\_xref="HGNC:6307"  
/db\_xref="PDB:1VR2"  
/db\_xref="PDB:1Y6A"  
/db\_xref="PDB:1Y6B"  
/db\_xref="PDB:1YWN"  
/db\_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:P35968"  
/translation="MQSKVLLAVALWLCVETRAASV"

## ORIGIN

1 cetccttccc ctgggctaa ggatatcttg gctggaagct etgctctgaa aaggggcatg  
61 gccaaacttt cactagggct ctctgttggg gaggcagatg gacaaaagcc ttcttggggc  
121 taggcaggte acttcaaact tggagcgcgc aaatattttg ggaaatagcg ggaatgctgg  
181 cgaactgggc aagtgcgttt tetgattaag agcaaccaga ttcagctttt taaactacaa  
241 ttatactggc caaacaaaat acccttatac aaaaacaaa actactggca ggagtcgctg  
301 ccagcttggc acccggcata ctggtctgag tateccttc tccttctggc ctccaaactg  
361 ctgcagatc teggcaact cagacgcgag cgatggcgaa gagggtctctg cactttgagc  
421 cgcttgggta gggagcgggtg ctctctcag cgctctcgtt gatctctccc aaatttcggg  
481 gaccggcaag cgattaaatc ttggagtgc tcagcgcgcg ttaccgagta cttttattt  
541 acaccagaaa caaagtgtt gctctgggat gttctctct gggcgacttg gggcccagcg  
601 cagtcagtt gtgtggggaa atggggagat gtaaatgggc ttggggagct ggagateccc  
661 gccgggtacc cgggtgaggg gcggggctgg ccgcacggga gagcccctcc tccgcccggg  
721 cccgcccgcg catggcccgc cctccgcct ctagagtctt ggtccagct cccacctgc  
781 actgagtcce gggaccgcg gagagcggtc agtgtgtggt cgctgcgttt cctctgctg  
841 cgccgggcat cacttgcgag ccgcagaaag tccgtctgga agcctggata tctctccta  
901 ccggcaccgc cagacgcctc tgcagcgcgc ggtcggcgcc egggtccct agcctgtgc  
961 gctcaactgt cctgcctgc ggggtgcgc gagttccacc tccgcgcctc cttctctaga  
1021 caggcctgag gagaaagaac cgctcccgga gttctgggca ttcgcccgcg ctgaggtgc  
1081 aggatgcaga gcaaggtgct gctggccgct gccctgtgga tctgctgga gaccggggcc  
1141 gcctctgtgg gtaaggagcc cactctggag gaggaaggca gacaggtcgg gtgagggcgg  
1201 agaggacctg aaagccagat ctaactcgga atcgtagagc tggagagttg gacaggaact  
1261 gacattt

**EK-4**

**HGF MINIMAL PROMOTOR BÖLGE**

LOCUS E09626 2184 bp RNA linear PAT 04-NOV-2005

DEFINITION DNA encoding human HGF.

ACCESSION E09626

VERSION E09626.1 GI:22026253

KEYWORDS JP 1995179356-A/1.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;  
Catarrhini; Hominidae; Homo.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 2184)

AUTHORS Nakamura,T. and Matsumoto,K.

TITLE EPITHELIOCYTE GROWTH PROMOTER

JOURNAL Patent: JP 1995179356-A 1 18-JUL-1995;

NAKAMURA TOSHIICHI

COMMENT OS Homo sapiens (human)

PN JP 1995179356-A/1

PD 18-JUL-1995

PF 28-DEC-1990 JP 1990419158

PI NAKAMURA TOSHIICHI, MATSUMOTO KUNIO

PC A61K38/00,A61K38/00//C12N15/16,C12P21/02,(C12P21/02,C12R1:91);

CC strandedness: Double;

CC topology: Linear;

FH Key Location/Qualifiers

FH

FT source 1..2184

FT /organism='Homo sapiens'

FT /tissue\_type='liver'

FT mat\_peptide 163..1482

FT /product='HGF alpha chain'

FT mat\_peptide 1483..2184

FT /product='HGF beta chain'.

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..2184

/organism="Homo sapiens"

/mol\_type="unassigned RNA"

/db\_xref="taxon:9606"

## ORIGIN

1 atgtgggtga ccaaactect gccagcctg ctgetgcage atgtcctect geatctect  
61 ctgetcecca tegccatccc ctatgcagag ggacaaaagga aaagaagaaa tacaattcat  
121 gaattcaaaa aatcagcaaa gactacceta atcaaaatag atccagcact gaagataaaa  
181 accaaaaaag tgaatactgc agaccaatgt gctaatagat gtactaggaa taaaggactt  
241 ccattcaett gcaaggttt tgttttgat aaagcaagaa aacaatgect ctggttcccc  
301 ttcaatagca tgcaagtgg agtgaaaaaa gaatttgccc atgaattga cctctatgaa  
361 acaaaagact acattagaaa ctgcatcatt ggtaaaggac gcagctaaa gggaacagta  
421 tctatcacta agagtggcat caaatgcag cctggagtt ceatgatacc acacgaacac  
481 agctttttgc ctcgagcta tgggggtaaa gacctacagg aaaactactg tegaaatcet  
541 cgaggggaag aagggggacc ctggtgttc acaagcaate cagaggtacg ctacgaagtc  
601 tgtgacatte ctcagtgttc agaagttaa tgcatacct gcaatgggga gagttatcga  
661 ggtctcatgg atcatacaga atcaggcaag atttgcage gctgggatca tcagacacca  
721 caccggcaca aattcttgc tgaagatat cccgacaagg gctttgatga taattattgc  
781 cgaateccg atggccagcc gaggccatgg tgetatactc ttgacctca caccgctgg  
841 gactactgtg caattaaac atgcgctgac aatactatga atgacactga tgttctttg  
901 gaacaactg aatgcatcca aggtcaagga gaaggctaca ggggactgt caataccatt  
961 tggaatggaa ttcatgta gcttgggat tctcagtatc ctcacgagca tgacatgact  
1021 cctgaaaatt tcaagtcaa ggacctacga gaaaattact gccgaaatcc agatgggtct  
1081 gaatcaccct ggtgtttac cactgatcca aacatccgag ttggctactg ctcccaaatt  
1141 ccaaactgtg atatgtcaca tggacaagat tgttatcgtg ggaatggcaa aaattatag  
1201 ggcaacttat cccaaacaag atctggacta acatgttcaa tgtgggacaa gaacatggaa  
1261 gacttacate gtcatactt ctgggaacca gatgcaagta agctgaatga gaattactgc  
1321 cgaaatccag atgatgatgc tcatggacce tgggtctaca cgggaaatcc actcattcet  
1381 tgggattatt gccctattc tegtttgaa ggtgatacca cacctacaat agtcaattta  
1441 gaccateccg taatatctt tgccaaaacg aaacaattgc gagttgtaaa tgggattcca  
1501 acacgaacaa acataggatg gatggttagt ttgagataca gaaataaaca tatctgcgga  
1561 ggatcattga taaaggagag ttgggttctt actgcacgac agtgtttccc ttctcgagac  
1621 ttgaaagatt atgaagcttg gcttgggaatt catgatgtcc acggaagagg agatgagaaa  
1681 tgcaaacagg ttctcaatgt tteccagctg gtatatggcc ctgaaggatc agatctggtt  
1741 ttaatgaagc ttgccagccc tgetgtctg gatgattttg ttagtacgat tgatttacct  
1801 aattatggat gcacaatcc tgaagagacc agttgcagt tttatggctg gggctacact  
1861 ggattgatca actatgatgg cctattaega gtggcacatc tctatataat gggaaatgag  
1921 aatgcagcc agcatcatcg agggaaggtg actctgaatg agtctgaaat atgtgctggg  
1981 gctgaaaaga ttggatcagg accatgtgag ggggattatg gtggcccact tgtttgtgag  
2041 caacataaaa tgagaatggt tcttgggtgc attgttctg gtcgtggatg tgccattcca  
2101 aatgctctg gtattttgt cegagtagca tattatgcaa aatggataca caaattatt  
2161 ttaacatata aggtaccaca gtca

## EK-5

### c-MET MINIMAL PROMOTOR BÖLGE

LOCUS AF046925 3020 bp DNA linear PRI 04-SEP-1998

DEFINITION Homo sapiens hepatocyte growth factor receptor (c-met) gene, promoter sequence.

ACCESSION AF046925

VERSION AF046925.1 GI:3273702

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Catarrhini;  
Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3020)

AUTHORS Liu, Y.

TITLE The human hepatocyte growth factor receptor gene: complete structural organization and promoter characterization

JOURNAL Gene 215 (1), 159-169 (1998)

PUBMED 9666114

REFERENCE 2 (bases 1 to 3020)

AUTHORS Liu, Y.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-FEB-1998) Medicine, Rhode Island Hospital, 593 Eddy Street, Providence, RI 02903, USA

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..3020

/organism="Homo sapiens"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:9606"  
/chromosome="7"

gene 1..3020

/gene="c-met"  
/note="hepatocyte growth factor receptor gene"

promoter 1..3020

/gene="c-met"

### ORIGIN

1 ctgcaggatga cagaagtccc agctaccagt gtctagaaca agttttgttt ttgtttttt  
61 tccacaaaac aagaaatctg gaagcagggtg tctactggca gtagggctgt acctcagcaa  
121 tgtcagcacc aacttctgca tgcctggcac aagatgggta gttcttcaact gggcatcata  
181 tatgaaatca agaagcaaga aaggaaaagg ggtggcacca gccttaaacc cttcccaca  
241 aggecccatc agactcaac ttatacctca ttaccagaat gacatcacat ggccatgtct  
301 agctgcaaag gagtctggga aagcaaatat ttctcttttc aagcccacaag agtggaggca  
361 ggaacaggaa aatctcgttg ggaacagatg ctggcttagc acaacagtgt ggaccacaag



421 agatttggtt tggtaagaa aataccaaca gaacttcac atacagtga tcacccatga  
481 catgaacca aggaaagtta aatagcaaca attaaaagtt tgctgcaaaa ccaaaattga  
541 attatagaac tctattacc ttttaaaata tctgttcca ttcattcca aaaatctgaa  
601 attatctgta aacatttcc caatcaaac tctctaggta gtgtgtaaaa attacttgac  
661 cttcacacac ccagatactt ttagtatgc tattgttagt tatgttatt cataaaatgt  
721 tatctctta ttacagttg ataaatgaaa tgatgattt caatacagtt tcaaaactgg  
781 attgaaattt tgttagttat tagaaactag aaagttcag tgctgaaaat acacaacggg  
841 ttgttgtat ttatcatcta ttttatttc cagtttgc atggctttct gggctttct  
901 acaacttaa ttgtaattt tttctttat attttatca tggcactca actcagaaaa  
961 cctgttaagg caactacata atgtgatcta aaaatccagt taacatattg ctatggaaac  
1021 caggaaatag aaacagcact ctaatcattc cttagacaa ctatggctct gtgtgtgtgt  
1081 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtaaaacttt taaattcat taatttatt atcttttatt  
1141 gaaagctgtt actgaacca aaatctgtaa ttgatctgc cataaatagg cccagtgcct  
1201 tattaccagt aaattagtgt ttttaatga gctatagta ttgataaatt atgccatgcc  
1261 gtatcaggaa atctccagtc aggcgcggtt gttatttag cctgctgagg cctcttggtg  
1321 tgggtggaag gacacctgac tgggtgaaa gctaagtct aacttgcct ctctactaa  
1381 ccagctatgt gactctctg ggaacttta gggactcagt tctttacct gcaaaatggt  
1441 tcaatgcaag actttagtaa cgtaatggga acttctctt tccataaac tggggaatca  
1501 agaggtaate tctttgagg actgaaatca ctcttatgta acctctggtt acattatcat  
1561 ttcaagtccc tggcacttg gaaatgataa ctattctac tacatttct tatgttcat  
1621 tctgtagtaa ataagaactg aacctgcata gtaactgta ttttaacca tgacttcaa  
1681 taacgaagat atctatgct cattatctat tgccatgatt gaacaagttg gtatgagagc  
1741 cggaaacgaac tcaagtteta accgcaatgc cgttctta gatctatta cctttgagtg  
1801 tctatttact ctgttagtg ccaatttta tagcgaata caaagttat ccaacacaat  
1861 tactctaat agagttcacc gaggecccaa aagctcttt ttaaaatca tcataagatt  
1921 tcaacattca agaattaaac tttgttctg ttgtcttat tctctctat ttgccagtt  
1981 attaatcag cctgcttcc gctatggaaa aaaaaaaga aaaaaagaaa tggagctct  
2041 ctcagggtta aactctctg ttgttctcc ttgcagaaat ttgagttatt atagtagagg  
2101 ataactgttg cataatgaaa tctttggac aattcgacca tcaactteta cctctcctc  
2161 taacaatgaa ctcttgtt ctgctgtgccc caatctctc taaaccgggg tgggcgctgg  
2221 gcggttagcg gagactggg agaggccgag agcaaagctc gcgccttcc cggggtcagc  
2281 ggcgggggtg ccaggagggt gcgcctctg ctctgagcc cggggtgaca ctgcctccc  
2341 aagcgcagg agggggagac tggctccgc ttatctcgg ctgtgctaac ttcagactgc  
2401 ctgagctggg ggaggagagc gcgcagccag ggcgagaaaa ctctccacc tagaaagttt  
2461 cacttgtctg tgggcggggc agaggcggga ggaaacgca ccccgcggg gccaggcgcg  
2521 gcgcggacgg caggaagggc gggggccgat tctctctgg gtggtgccc tccccctc  
2581 agcggctctc ggaaccgcg gactagggga cggacagcac gcgaggcaga cagacactg  
2641 ctggggcggg caggcgagcg cctcagtctg gtcgctggc ggtgctctc gcccacgc  
2701 gcccgggccc ccgcccggc cgcgcgcca tgcggctg agtcaactggc agggcagcgc  
2761 gcgtgtggga agggggcggg ggagtgcgce cggcgggccc gggggcctt gggctcagc  
2821 gggcgcagg tgaccggag gccctgcgc cgcgcccga gcctttgtg agcagatgcg  
2881 gagccgagtg gagggcgcga gccagatgcg gggcgacagc tgacttctg agaggaggcg  
2941 gggaggcgcg gacgctgtg gctctgcgc cctgactt ccaactggtt cctgggcacc  
3001 gaaaggtaaa attgccagcc