



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



HEMOFİLİ HASTALARINDA ENDOGLİN VE ÇEŞİTLİ ANJİYOGENİK FAKTÖRLERİN İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kübra KARAMAN ANUK

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HEMOFİLİ HASTALARINDA ENDOGLİN VE
ÇEŞİTLİ ANJİYOGENİK FAKTÖRLERİN
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Kübra KARAMAN ANUK

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz BAKAR ATEŞ

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
19L0237010 proje numarası ile desktelenmiştir.**

ANKARA

2022

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hemofili Hastalarında Endoglin ve Çeşitli Anjiyogenetik Faktörlerin İlişkisinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kübra KARAMAN ANUK

Tarih:

İmza:

KABUL ve ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Kübra Karaman Anuk tarafından hazırlanan “Hemofili Hastalarında Endoglin ve Çeşitli Anjiyogenetik Faktörlerin İlişkisinin Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hemofili	1
1.2. Hemostatik Mekanizma	1
1.2.1. Koagülasyon Kaskadı	2
1.3. Hemofili Hastalarının Tipleri	4
1.4.1. Pıhtılaşma Faktörü Düzeyine Göre Sınıflandırma	5
1.4.2. Nedensellik Modeline Göre Sınıflandırma	7
1.5. Risk Faktörleri	7
1.5.1. Yaş	7
1.5.2. Cinsiyet	8
1.5.3. Genetik	8
1.5.4. Etnik Köken / Irk	9
1.5.5. Diğer Risk Faktörleri	9
1.6. Epidemiyoloji ve İnsidans	9
1.7. Anjiyogenez	10
1.8. Hemofilik Artropati	12
1.9. Hemofilik Artropatide Anjiogenez Faktörleri	15
1.9.1. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)	16
1.9.2. İnterlökin-4 (IL-4)	20
1.9.3. İnterlökin-12 (IL-12)	22
1.9.4. İnterferon Alfa (IFN- α)	23
1.9.5. İnterferon Gama (IFN- γ)	24
1.9.6. İnsan Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1)	25
1.9.7. İnsan Trombospondin-1	26
1.9.8. Anjiopoetin-1 (Ang-1)	27
1.9.9. Anjiopoetin-2 (Ang-2)	28
1.9.10. Endoglin	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Çalışma Grubu	32
2.2. Kullanılan Cihazlar	33
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
2.4. ELİSA Ölçümleri	34
2.4.1. Plazma Endoglin Düzeyi Tayini	35
2.4.2. Plazma IL-4 Düzeyi Tayini	36
2.4.3. Plazma IL-12 Düzeyi Tayini	38

2.4.4. Plazma IFN- α Düzeyi Tayini	39
2.4.5. Plazma IFN- γ Düzeyi Tayini	40
2.4.6. Plazma TSP-1 Düzeyi Tayini	41
2.4.7. Plazma PAI-1 Düzeyi Tayini	43
2.4.8. Plazma ANG-1 Düzeyi Tayini	44
2.4.9. Plazma ANG-2 Düzeyi Tayini	45
2.4.10. Plazma VEGF Düzeyi Tayini	47
2.5. Gen Ekspresyon Analizleri	48
2.5.1. Plazmadan RNA İzolasyonu	48
2.5.2. cDNA Sentezi	51
2.5.3. Real-Time PCR Analizi	52
2.6. Platelet İzolasyonu ve Anneksin V Bağlanma Analizi	53
2.7. İstatistiksel Analiz	54
3. BULGULAR	55
4. TARTIŞMA	67
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	73
ÖZET	76
SUMMARY	77
KAYNAKLAR	79
EKLER	94

ÖNSÖZ

Bu tezin amacı, hemofilinin en sık gözlenen komplikasyonlarından biri olan hemofilik artropatide, endoglin düzeyleri ve anjiyogenetik faktörlerin ilişkisinin değerlendirilerek, adipositokinlerin bu alandaki rolünün aydınlatılmasıdır.

Bu tez çalışması için doktora tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Filiz Bakar Ateş'e ve emeği geçen tüm bilim insanlarına teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez sürecimde, en başta bir fikir olarak kendisine gittiğimde bana inanan ve bu süreçte polikliniklerini açarak ve çalışmalarına koşulsuz destek olan, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalından Sayın Prof. Dr. Selin Aytaç Eyüpoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve her zaman en büyük destekçim olan annem ve bana ilham kaynağı olan 3 yaşındaki canım oğlum olmak üzere, bu süreçte yanımda olan tüm aileme teşekkür ederim. Bu tez size ithaf edilmiştir. Başarılar sizinle anlamlı.

Bu tez çalışması ile birlikte, ilk kez ilaç endüstrisi kariyerim sırasında tanışıp, büyük bir zevkle çalıştığım hemofili alanındaki deneyimimi, akademik hayatımla birleştirme şansı buldum. Bu nedenle benim için bu tezin yeri çok özel ve anlamlıdır.

Herşeyden öte bu çalışma ile, literatüre ve en önemlisi hasta sağlığına ufak da olsa bir dokunuş yapmanın mutluluğu içerisindeyim. Bilim gerçeğe giden yolları aydınlatan ışıktır. Daha nice çalışmaya ışık tutması dileğiyle...

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACVRL	Aktivin A reseptör benzeri kinaz 1
ANG-1	Anjiopoetin-1
ANG-2	Anjiopoetin-2
ANOVA	Varyans analizi
ANXV	Annexin V
ATF-2	Aktive transkript faktör-2
CD4 ⁺	Yardımcı T hücreleri
CD8 ⁺	Sitotoksik T hücreleri
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
COX-2	Siklooksijenaz-2
CV	Test içi varyasyon katsayısı
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	ECM
ENG	Endoglin
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FI	Fibrinojen
FII	Protrombin
FIX	Faktör 9
FV	Faktör 5
FVII	Faktör 7
FVIII	Faktör 8
FVIIIa	aktive Faktör 8
FX	Faktör 10
FXI	Faktör 11

FXII	Faktör 12
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
HHT1	Hemorajik telenjiektazi tip-I
HIF-1	Hipoksi indüklenebilir faktör 1
HLA-2	Histo-uyumluluk antijenleri sınıf II
HMWK	Yüksek mol ağırlıklı kininojen
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	Horseradish peroksidaz enzimi
IFN- α	İnterferon alfa
IFN- β	İnterferon beta
IFN- γ	İnterferon gamma
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentezi
JAK-1	Janus kinaz
KDR	VEGFR-2
MMP	Matris metalloproteinaz
MSC	Mezenkimal kök hücreleri
NO	Nitrik oksit
PAI-1	İnsan plasminojen aktivatör inhibitör-1
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PECAM-1	Platelet endotel hücre adhezyon molekülü
PGE-2	Prostaglandin E2
PGIF	Plesental büyüme faktörü

PLA-2	Fosfolipaz A2
rmGM-CSF	Rekombinant murin granülosit-makrofaj koloni-stimüle edici faktör
RNA	Ribonükleik asit
SABC	HRP-streptavidin
SD	Standart sapma
sFlt1	Çözünür fms benzeri tirozin kinaz-1
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TAFI	Trombin ile aktive edilebilen fibrinoliz inhibitör
TGF- α	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü beta
Th1	Yardımcı T-1 hücreleri
Th2	Yardımcı T-2 hücreleri
TIMPS	Metalloproteinaz doku inhibitörü
Tie	Endotelium spesifik reseptör tirozin kinaz
TMB	Tetrametil benzidin substratı
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
t-PA	Doku tipi plazminojen aktivatörleri
TSP-1	İnsan trombospondin-1
VCAM-1	Vasküler hücre yüzeyi adezyon molekülü-1
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFA	Vasküler endotel büyüme faktörü a izoformu
VEGFR1	Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
vWF	Von willebrand faktörü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Koagülasyon kaskatının şekilsel gösterimi.	4
Şekil 1.2. Hemofilide en çok kanayan dokular.	14
Şekil 1.3. Hemofilide eklem tutulumu.	15
Şekil 1.4. VEGF'in hücre membranında gösterilmesi.	18
Şekil 1.5. TSP1'in moleküler yapısı.	27
Şekil 2.1. Endoglin ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	36
Şekil 2.2. IL-4 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	37
Şekil 2.3. IL-12 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	39
Şekil 2.4. IFN- α ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	40
Şekil 2.5. IFN- γ ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	41
Şekil 2.6. TSP-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	42
Şekil 2.7. PAI-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	44
Şekil 2.8. ANG-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	45
Şekil 2.9. ANG-2 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	46
Şekil 2.10. VEGF ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.	48
Şekil 3.1. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında endoglin düzeyleri .	56
Şekil 3.2. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IL-4 düzeyleri.	57
Şekil 3.3. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IL-12 düzeyleri.	57
Şekil 3.4. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IFN- α düzeyleri.	58
Şekil 3.5. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IFN- γ düzeyleri.	58
Şekil 3.6. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında PAI-1 düzeyleri.	59
Şekil 3.7. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında TSP-1 düzeyleri.	59
Şekil 3.8. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında ANG-1düzeyleri.	60
Şekil 3.9. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında ANG-2düzeyleri.	60
Şekil 3.10. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında VEGF düzeyleri.	61
Şekil 3.11. Hemofili hastalarında ENG ve ANG-2 sitokinleri arasındaki korelasyon ilişkisi.	62
Şekil 3.12. Kontrol grubuna ait endoglin amplifikasyon eğrisi.	62
Şekil 3.13. Hemofili grubuna ait endoglin amplifikasyon eğrisi.	62
Şekil 3.14. Kontrol grubuna ait HIF-1 α amplifikasyon eğrisi.	63
Şekil 3.15 Hemofili grubuna ait HIF-1 α amplifikasyon eğrisi.	63

Şekil 3.16. Kontrol grubuna ait PGE2 amplifikasyon eğrisi.	63
Şekil 3.17. Hemofili grubuna ait PGE2 amplifikasyon eğrisi.	63
Şekil 3.18. Kontrol grubuna ait VEGFA amplifikasyon eğrisi.	64
Şekil 3.19. Hemofili grubuna ait VEGFA amplifikasyon eğrisi.	64
Şekil 3.20. Kontrol grubuna ait VEGFR1 amplifikasyon eğrisi.	64
Şekil 3.21. Hemofili grubuna ait VEGFR1 amplifikasyon eğrisi.	65
Şekil 3.22. Kontrol ve hemofili grubunda çeşitli genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.	66
Şekil 3.23. Trombositlere annexin V (ANX5) bağlanma analizi bulguları.	66



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Hemofili A ve B'nin sınıflandırılması.	6
Çizelge 1.2. İnterferon gama'nın başlıca fonksiyonları.	25
Çizelge 3.1. Hastaların ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri.	55
Çizelge 3.2. Anjiogenez ilişkili sitokinler ve biyobelirteçlerin hemofili hastaları ve kontrol grubuna ait plazma düzeyleri.	56
Çizelge 3.3. Anjiyogenez ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.	65



1. GİRİŞ

1.1. Hemofili

Hemofili, koagülasyon faktörlerinin eksikliğinden kaynaklanan, nadir görülen kalıtsal bir kanama bozukluğu hastalığıdır (Peyvandi ve ark., 2016).

Hemofili, spontan kanama olayları (örn. dokular,kaslar, eklemler) ve yaralanma sonrası abartılı veya uzun süreli kanama ile kendini gösterir. Bu kanamaların çoğunluğunu ise genellikle eklem içi ve kas içi kanamalar oluşturur (Srivastava ve ark., 2013).

1.2. Hemostatik Mekanizma

Hemostaz; kan damarlarındaki olası bir yaralanma sırasında, gerekli miktarda fibrin oluşumunu sağlayarak, kanamayı durdurup, dengeleyen süreçlerin tümü olarak tanımlanır (Schenone ve ark., 2004).

Yaralanmaya tepki olarak, vücutta damar hasarı olan bölgeyi onarmak üzere karmaşık bir süreç olan hemostaz harekete geçirilir. Amaç, hasarlı kan damarının iyileşmesini sağlayacak bir trombosit ve fibrin pıhtısı oluşturmaktır (Monroe ve ark., 2006).

Damar duvarında oluşan kanamayı önlemek için ilk olarak kan damarlarının daralıp büzüşmesi ile vazokonstriksiyon meydana gelir. Trombositlerin, von willebrand faktörü (vWF) aracılığıyla tip-IV kollajene tutunması trombosit adhezyonu olarak bilinir. Trombositlerin birleşerek küme oluşturmaları ise trombosit aggregasyonu ile tanımlanır (Nurden ve ark., 2011).

Damar duvarı hasarından sonra vasküler yanıt ile birlikte trombositlerin küme oluşturarak trombosit tıkaçı meydana getirmesi primer (birincil) hemostaz olarak tanımlanır. Primer hemostazda; trombositler, von willebrand faktörü ve çeşitli endotel damar duvarı hücreleri görev alır. Sekonder hemostaza göre daha zayıf bir trombosit tıkaçı meydana gelir (Versteeg ve ark., 2013).

Primer ve sekonder hemostaz, kan damarlarının yaralanması sonucu oluşan kan kaybının önlenmesinden sorumlu olan hemostazın iki aşamasını oluşturmaktadır. Daha büyük kanamalarda kan kaybını önlemek için protrombinin trombine dönüşerek daha sağlam ve stabil bir pıhtı elde edilmesi ise sekonder hemostaz olarak tanımlanır (Mackman, 2009).

Koagülasyonu sağlayan stabil bir pıhtı oluşumundan sorumlu bir dizi yolak vardır. Nitekim hemofili de koagülasyon faktörlerinin eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal bir hastalık olduğu için koagülasyon kaskadını iyi tanımak önemlidir.

1.2.1. Koagülasyon Kaskadı

Geleneksel koagülasyon kaskadında, bir pıhtı oluşturmak için fibrin üretme nihai hedefi ile ortak bir yola sahip, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki farklı yol vardır (Davie ve ark., 1991).

Plazma pıhtılaşma faktörleri, pıhtılaşma sürecinde çok özel rollere sahiptir. Bu faktörler bir Roma rakamıyla anılır, ancak bazılarının bir adı da vardır. Örneğin faktör II (FII), protrombin olarak da bilinir. Küçük bir 'a' harfinin eklenmesi, faktörün aktive edilmiş halini gösterir (Miletich ve ark., 1980). Koagülasyon kaskadında, faktörler ve bileşenler bir sıra ile etkileşime girerler ve bu süreç kademeli olarak gerçekleşir.

1.2.1.1. İntrensik Yolak

“Temas Aktivasyon Yolu” olarak da bilinir. Dolaşımdaki kan, yaralanma nedeni ile hasar görmüş kan damarı duvarının yüzeyiyle temas ettiğinde etkinleştir (Hoffman, 2003; Vos ve ark., 2016).

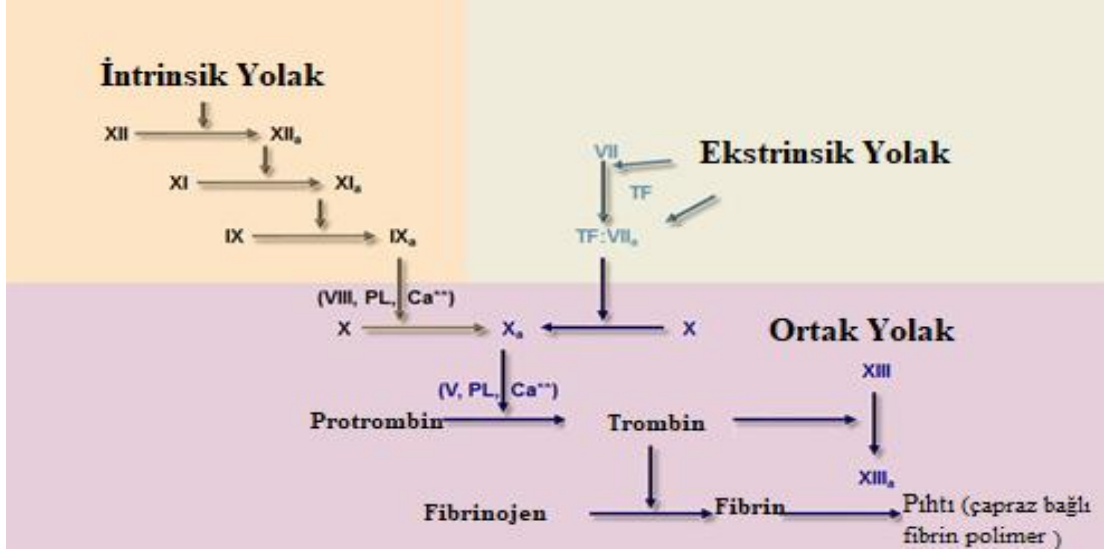
- İntrensik yolak; faktör VIII, IX, XI, XII ile prekallikrein ve yüksek mol ağırlıklı kininojen (HMWK)’i içerir.
- Faktör IX, XI ve XII inaktif enzim proküsörleri (proenzim), FVIII ise glukoprotein olarak işlev görür.
- Faktör VIII, kofaktör olarak IX aracılığı ile X faktörünü aktive etmek için görev alır (Gailani ve ark., 2007).

1.2.1.2. Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik Yolak, doku faktörü ve Faktör VII’den oluşan daha baskın bir pıhtı oluşumundan sorumlu “Doku Faktör Yolağı” olarak da bilinen yoldur. Kan damarında meydana gelen doku hasarı ile aktive edilmektedir (Hoffman, 2003; Vos ve ark., 2016).

1.2.1.3. Ortak Yolak

Ortak Yolak, intrinsik ve ekstrinsik yolların ortak yolu oluşturarak buluşması ve bunun neticesinde de pıhtı oluşumunun meydana geldiği yoldur (Mannucci ve ark., 1991). Ortak yolak, Faktör I, II, V ve X’i içermektedir. Faktör I (fibrinojen) ve V glikoproteinlerdir. Faktör II (protrombin) ve X ise, aktif enzim formlarına dönüştürülen inaktif zimojenlerdir (Hoffman, 2003).



Şekil 1.1. Koagülasyon kaskadının şekilsel gösterimi (Hoffman, 2003).

Hemofili hastalarında FVIIIa/IXa kompleksi, pıhtılaşma kaskadı sırasında normalde olduğu gibi trombosit yüzeyinde oluşmaz. Sonuç olarak, tenaz kompleksi, büyük bir trombin patlaması için yeterli FX'i aktive etmez (Mann, 2003).

Bu trombin olmadan patlama ve ardından fibrinojenin fibrine dönüşmesi, hemostatik tıkaç stabil değildir ve uzun süreli kanamaya yol açar. Bozukluğun komplikasyonları arasında tekrarlayan eklem ve kas kanamaları, yaralanma veya ameliyattan sonra aşırı kanama ve ciddi vakalarda ölüm riskini içerir.

1.3. Hemofili Hastalarının Tipleri

Hemofili A koagülasyon faktörü VIII'in kalıtsal olarak eksikliği veya hiç olmaması nedeniyle oluşurken, Hemofili B hastalarında koagülasyon faktörü IX eksikliği veya yokluğu söz konusudur. (Wight ve ark., 2003; Mannucci ve ark., 2013). Her iki tip de kalıtsal olarak X kromozomuna bağlı olarak aktarıldığından ötürü erkek hastalarda çok daha sık görülmektedir. Genellikle hemofili hastalarının anneleri ve kız çocukları ise hemofili hastalığının taşıyıcısı olarak yer almaktadır.

Hemofili C ise faktör XI (FXI) eksikliği veya yokluğu ile tanımlanır ve, Hemofili A ve B'den farklı olarak, otozomal resesif olarak aktarılan bir özellik gösterir. Faktör XI pıhtının büyümesinde ve devamlılığında kritik bir rol oynar. FXI eksikliği milyonda bir olarak saptanmasına karşın, Aşkenazi Yahudilerinde prevalansı yüksektir ve bu grubun %8-9'u heterozigottur (Shpilberg ve ark.,1995).

Bu tez çalışmasında Hemofili hastalığının temel iki tipi olan Hemofili A ve Hemofili B hastaları değerlendirilmiştir.

1.4.Hemofili Hastalarının Sınıflandırılması

Hemofilide etyolojiye ve klinik duruma göre iki sınıflama sistemi vardır.

1.4.1. Pıhtılaşma Faktörü Düzeyine Göre Sınıflandırma

1.4.1.1. Ağır Hemofili Hastaları

Pıhtılaşma faktörü aktivite seviyesi normalin %1'inden azdır (1 birim / dL'den az) (White, 2001, Blanchette ve ark., 2014). Sık görülen spontan kanama atakları ve küçük yaralanmalardan sonra kanama ile karakterizedir. Ayda iki ila beş spontan kanama görülebilmektedir (Furukawa ve ark., 1993) Hemofili A hastalarının yaklaşık %60'ı ağır hemofili hastalığına sahiptir (Ragni, 2012).

Hemofili B hastalarının yaklaşık %40'ının ağır hemofili B hastası olduğu bildirilmiştir (Soucie ve ark., 1998). Ayda iki ila beş spontan kanama görülebilmektedir (Furukawa ve ark., 1993).

1.4.1.2. Orta Hemofili Hastaları

Pıhtılaşma faktörü aktivite seviyesi normalin %1 ila %5'i (1-5 ünite / dL) arasındadır (White, 2001; Blanchette ve ark., 2014). Travma sonrası şiddetli kanama ve küçük yaralanma sonrası kanama ile karakterizedir. Hemofili A hastalarının %15'i orta hemofili hastasıdır (Ragni, 2012). Kanama sıklığı ayda bir ile yılda bir arasında değişmektedir (Furukawa ve ark., 1993).

1.4.1.3. Hafif Hemofili Hastaları

Pıhtılaşma faktörü aktivite seviyesi normalin %5'inden fazla, %40'ından ise azdır (5 birim / dL'den fazla; ancak, 40 birim / dL'den az) (White, 2001; Blanchette ve ark., 2014). Ağır travma sonrası şiddetli kanama ile karakterizedir.

Kanama epizotları yılda bir kez veya seyrek olarak on yılda bir meydana gelebilir (Furukawa ve ark., 1993). Hemofili A hastalarının %25'i hafif hemofili hastasıdır (Ragni, 2012).

Çizelge 1.1. Hemofili A ve B'nin sınıflandırılması.

	Sınıflandırma		
	Ağır	Orta	Hafif
Hastaların yüzdesi	50-70	10	30-40
Faktör VIII veya faktör IX aktivitesi, %	<1	1-5	6-30
Kanama olaylarının paterni	~ Ayda 2-4	~ Yılda 4-6	Yaygın olmayan
Kanama nedenleri	Doğal	Küçük travma	Büyük travma cerrahisi

1.4.2. Nedensellik Modeline Göre Sınıflandırma

1.4.2.1. Konjenital Hemofili

X kromozomunda bulunan F8 geninin kalıtsal varyantlarından kaynaklanır. Klinik olarak belirgin hastalık, esas olarak erkekleri etkilemektedir ve tipik X'e bağlı kalıtım modeli ile aktarılmaktadır.

1.4.2.2. Edinsel Hemofili

Koagülasyon sisteminde bir bozukluk olmayan ve normal olan bireylerde, spontan olarak Faktör VIII'e karşı gelişen otoantikorlardan dolayı oluşan bir kanama bozukluğu olarak tanımlanır. Hamilelik, otoimmün bir bozukluk ya da altta yatan başka bir durumla ilişkili olabilir (Shetty ve ark., 2010).

1.5. Risk Faktörleri

1.5.1. Yaş

Kalıtsal hemofili olan tüm hastaların durumu doğumdan itibaren vardır; ancak, şiddetine bağlı olarak farklı zamanlarda mevcut olabilmektedir (Konkle ve ark., 1993). Hastalığın şiddetli olduğu durumlarda yaşamın ilk 2 yılında ortaya çıkarken, orta derecede hemofili olanlar genellikle okul çağına doğru teşhis edilebilmektedir. Hafif hastalık ise, ergenliğe ya da yetişkinliğe kadar tanınmayabilir.

Edinsel hemofili genellikle ileri yaştaki yetişkinlerde görülmektedir. (Ortalama yaş, 77 yaş olarak belirtilmektedir (Collins ve ark., 2010); ancak, belirli tetikleyici koşullara sahip (örn. gebelik, otoimmün hastalıklar) daha genç insanlarda da görülebilmektedir (Paddock ve ark., 2016).

1.5.2. Cinsiyet

Kalıtsal hemofili A'nın klinik belirtileri erkeklerde daha yaygındır. Dişi taşıyıcıların yaklaşık %30'unun pıhtılaşma aktivitesi %40'tan azdır ve klinik olarak anlamlı anormal kanama yaşayabilmektedirler (Konkle ve ark., 1993).

1.5.3. Genetik

F8 gen mutasyonları (Xq28'de pıhtılaşma faktörü VIII), X'e bağlı resesif kalıtım yoluyla kalıtsal hemofiliye neden olmaktadır (McKusick, 2007).

F8 geninin 2000'den fazla farklı mutasyonu tanımlanmıştır; en yaygın olanı intron 22 inversiyonudur (Kumar ve ark., 2013).

Spesifik mutasyonlar, fenotipin ciddiyeti ile ilişkili olabilir; örneğin; intron 22 inversiyonunun ciddi hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Hoffman ve ark., 2013).

Kan ürünlerine ya da rekombinant replasman faktörüne maruz kaldıktan sonra hemofili olan bir kişinin inhibitörler (alloantikorlar) geliştirme olasılığı da belirli mutasyon türleri ile ilişkilidir. Örneğin; ortak intron 22 inversiyonunun, %20 ila %25 oranında bir inhibitör geliştirme riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hoffman ve ark., 2013).

Ayrıca, hastaların yaklaşık %70'inin ailesinde hemofili öyküsü bulunmaktadır (Paddock ve ark., 2016). Ancak hemofili hastalarının yaklaşık 1/3'lük bir kısmında hiçbir aile öyküsü olmadan, spontan de-novo mutasyonlar ile de hastalık meydana gelebilir (Kumar ve ark., 2013). Gen varyantlarının bazı edinilmiş hemofili vakalarında faktör VIII otoantikorlarının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Peyvandi ve ark., 2016).

1.5.4. Etnik Köken / Irk

Kalıtsal hemofili A, herhangi bir etnik veya ırksal grupta ilişkilendirilmemiştir (Croteau, 2018).

1.5.5. Diğer Risk Faktörleri

Edinilmiş hemofili A genellikle başka bir altta yatan durumla ilişkilidir; vakaların yaklaşık %50'si idiyopatiktir (Sborov ve ark., 2012). En sık rastlanan risk faktörleri arasında, maligniteler (%11,8), otoimmün hastalıklar (%11,6) ve gebelik (%8,4) gelmektedir (Knoebler ve ark., 2012).

1.6. Epidemiyoloji ve İnsidans

Ağır Hemofili B hastalarının, Ağır Hemofili A hastalarına kıyasla inhibitör geliştirme riski 10 kat daha düşüktür (%3'e karşı %30) (Lee ve ark., 1998).

İnhibitör oluşumu için çok düşük bir riskle ilişkili FIX gen mutasyonları, tekli amino asit değişimleridir. İnhibitör gelişimi riski, çerçeve kayması mutasyonları, erken durdurma kodonları, büyük delesyon ve ekleme bölgesi mutasyonları gibi daha önemli mutasyonlar ile %20'ye yaklaşmaktadır (Lee ve ark., 1998; Kar ve ark., 2014).

Hemofili, ırksal olarak farklılık göstermeyen bir hastalıktır. Hemofili A'nın insidansı 5 000 ila 10 000 yenidoğan erkekte 1'dir. Hemofili B, 100 000'de 1'lik bir insidansla çok daha nadir bir hastalık olma özelliğini gösterir (Ehrenforth ve ark., 1992).

1.7. Anjiyogenez

Anjiyogenez, yeni kan damarı oluşumu süreci olup, iyileşen bir yara ortamını desteklemek için gereklidir. Yaralanmadan sonra, aktive edilmiş endotel hücreleri, postkapiller venüllerin bazal membranını bozarak hücrelerin bu boşluktan göç etmesine izin verir. Bu göç eden endotel hücrelerinin bölünmesi, tübül ya da lümen oluşumu ile sonuçlanır. Sonunda, taban zarının birikmesi meydana gelir ve kılcal olgunlaşma ile sonuçlanır (Folkman, 2006; Todorova ve ark., 2017; Huang ve ark., 2019).

Endotel, yaralanmadan sonra birçok çözünür faktöre maruz kalır ve trombosit hücreleri ile temas eder. Bu etkileşimler, vasküler hücre yüzeyi adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi hücre yüzeyi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun artışı ile sonuçlanır. Plazmin ve metalloproteinazlar gibi matriksi bozan enzimler salınır ve aktive olur. Bunlar endotelyal bazal membranını bozar. Yaralanmış endotel hücreleri, integrin gibi adezyon moleküllerini salgılar. İntegrinler fibrin, fibronektin ve fibrinojene bağlanmayı ve geçici matriks iskeleti boyunca endotel hücre göçünü kolaylaştıran moleküllerdir. Endotel hücrelerinde de bulunan platelet endotel hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1), yaraya göç ettikçe birbirleriyle olan etkileşimleri düzenlenir (Abhinand ve ark., 2016; Imamaki ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019).

Kılcal damar oluşumu, endotel hücre yüzeylerindeki adezyon molekülleri tarafından modüle edilen hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini içeren karmaşık bir süreçtir. PECAM-1'in hücre-hücre temasına aracılık ettiği gözlenmiştir, oysa integrin β_1 reseptörleri bu temasları stabilize etmeye ve endotel hücreleri arasında "gap junction" denen bağlantıları oluşturmaya yardımcı olabilir. Yeni kılcal damarların bazıları arteriyollere ve venöz damarlara farklılaşırken, diğerleri makrofajlar tarafından yutulmak üzere apoptoza uğrar (Imamaki ve ark., 2018; Kiseleva ve ark., 2018).

Anjiyogenezin, ağırlıklı olarak makrofajlar ve trombositler tarafından üretilen çeşitli sitokinler tarafından uyarıldığı ve manipüle edildiği bilinmektedir. Makrofaj,

TNF- α üretmekte, ve enflamatuar faz sırasında anjiyogenezi düzenlemektedir. Kapiller endotel hücrelerinin migrasyonunu uyarabilen heparin, bir grup anjiyojenik faktöre yüksek afinite ile bağlanır (Repsold ve ark., 2017; Wojtukiewicz ve ark., 2017).

PDGF büyüme faktörleri ailesinin bir üyesi olan VEGF, güçlü anjiyojenik aktiviteye sahiptir. Yara iyileşmesi sırasında keratinositler, makrofajlar, endotel hücreleri, trombositler ve fibroblastlar tarafından büyük miktarlarda üretilir (Gianni-Barrera ve ark., 2018). Doku hasarının ayırt edici özellikleri olan hücre bozulması ve hipoksi, VEGF ve reseptörü gibi yara bölgesinde güçlü anjiyojenik faktörlerin güçlü başlangıç indükleyicileri olarak görünmektedir. VEGF-A, anjiyogenezdeki erken olayları destekler ve ardından yara iyileşmesi için önemli role sahiptir. Tirozin kinaz yüzey reseptörlerine bağlanır. Bu durum kan damarı organizasyonu, endotelial hücre kemotaksisi, proliferasyon ve farklılaşma için önemlidir. Hayvan çalışmaları, VEGF-A uygulamasının diyabetik iskemik uzuvlarda bulunan bozulmuş anjiyogenezi düzelttiğini göstermiştir. Bununla birlikte, diğer çalışmalar eksojen VEGF'nin vasküler sızıntıya ve düzensiz kan damarı oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Yara iyileşmesi sırasında da yükselen VEGF-C, esas olarak makrofajlar tarafından salınır ve yara iyileşmesinin iltihaplanma aşamasında önemlidir. Esas olarak makrofajlarda ve lenfatik endotelde eksprese edilen VEGF reseptörü-3 (VEGFR-3) aracılığı ile çalışmasına rağmen, vasküler geçirgenliği artırarak VEGFR-2'yi de aktive edebilir (Liang ve ark., 2017; Siedlecki ve ark., 2017; Bai ve ark., 2018).

Hem asidik hem de bazik fibroblast büyüme faktörlerinden FGF-1 ve FGF-2, bozulmuş parankimal hücrelerden salınmakta olup, anjiyogenezin erken uyarıcılarıdır. FGF-2, yara onarımının ilk 3 günü içinde başlangıç anjiyojenik uyarıyı sağlar, ardından 4 ila 7. günlerde VEGF'nin aracılık ettiği daha sonra uzun süreli bir uyarıcı sağlar. VEGF ve FGF-2'nin anjiyogenez üzerinde doza bağlı bir etkisi vardır. Hem TGF- α hem de EGF, endotel hücre proliferasyonunu uyarır. TNF- α endotelial hücreler için kemotaktiktir; kılcal damar oluşumunu teşvik eder ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF-1) indüksiyonu yoluyla anjiyogeneze aracılık

edebilir. İndüklenebilir nitrik oksit (NO) sentaz ve VEGF dahil olmak üzere diğer hipoksiye duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenler. HIF-1 α mRNA, ilk 24 saat boyunca yara enflamatuvar hücrelerinde belirgin şekilde bulunur, ve HIF-1 α proteini, in vitro yaralanmadan 1 ve 5 gün sonra yaradan izole edilen hücrelerde mevcuttur. Veriler ayrıca, endojen NO ve VEGF arasında, endojen NO arttırıcı VEGF sentezi ile pozitif bir etkileşim olduğunu da göstermektedir. Benzer şekilde, VEGF'nin anjiyogeneze NO sentezini desteklediği gösterilmiştir, bu da NO'nun, endotelial hücre proliferasyonu ve organizasyonu için gerekli VEGF sinyallemesine aracılık ettiğini düşündürmektedir (Han ve ark., 2019; Rattner ve ark., 2019; Wysoczynski ve ark., 2019; Bakar ve ark., 2020).

TGF- β , fibroblastlar için bir kemoatraktandır ve fibroblasta FGF'ler üretmesi için sinyal göndererek anjiyogeneze yardımcı olduğu tahmin edilmektedir. Anjiyogenezi indüklediği gösterilen diğer faktörler arasında anjiyojenin, IL-8 ve laktik asit yer alır. Yara bölgesinden gelen fibronektin ve hyaluronik asit gibi matriks materyallerinin birçoğu anjiyojeniktir. Fibronektin ve fibrin, makrofajlar ve hasarlı endotel hücreleri tarafından üretilir. Kolajen, in vitro olarak endotel hücrelerinin tübüler oluşumuna neden olarak etkileşime giriyor gibi görünmektedir. Anjiyogeneze, ekstraselüler matriks materyali ve sitokinlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Khuu ve ark., 2017; Muppala ve ark., 2017).

1.8. Hemofilik Artropati

Hemofili hastalarında, tekrarlayan hemartrozlar hemofilik artropati ile sonuçlanarak majör morbiditeye neden olur. Tekrarlayan eklem kanamalarının başlattığı birleşik dejeneratif ve enflamatuvar süreçler dizisi olan hemofilik artropatiye yol açmaktadır. Bilhassa, aynı eklemde ortaya çıkan ve birbirini takip eden kanamalar geri dönüşsüz eklem içi değişiklikleri neden olur ve bunun sonucunda da hemofilik artropati gelişir (Gringeri A ve ark., 2014).

Ağır hemofili hastalarında yılda 20-30 kez eklem kanaması ortaya çıkabilmektedir. Profilaksi alan Hemofili A hastalarının çoğu haftada ≥ 3 kez veya haftada iki kez tedavi edilmektedir. Profilaksi alan hastalar için medyan yıllık kanama hızı (ABR), ağır HA için 1.0 ila 4.0 ve ağır HB için 1.0 ila 6.0 arasında değiştiği bildirilmiştir (Berntorp ve ark., 2017).

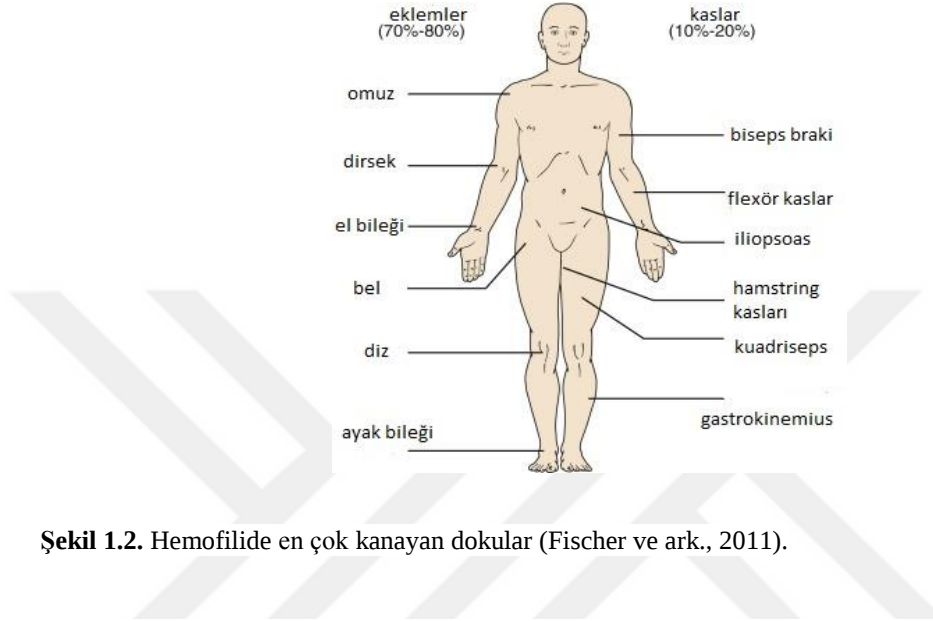
Ağır hemofilinin en yaygın romatolojik komplikasyonu, esas olarak dirsekleri, dizleri ve ayak bileklerini etkileyen hemofilik artropatidir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, yaşam boyu aynı eklem içerisine 2-3 kez kanama olmasının dahi geri dönüşsüz progresif yapısal değişiklikleri tetiklediğini, fiziksel fonksiyonları ve yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilediğini göstermektedir. Bu nedenle hastalarda hedeflenen klinik sonuç “sıfır kanama” özellikle de “0 eklem kanaması” olmalıdır (Gringeri A ve ark., 2014).

Ağır hemofili hastalarında, tüm kanama olaylarının %70 ila %80'i kendiliğinden meydana gelir (Stephensen ve ark., 2009; Fischer ve ark., 2011). Diğer doku bölgelerine kıyasla eklemdeki kanama eğilimi, pıhtılaşma kademesindeki dengenin bozulmasından kaynaklanır.

Koagülasyon kaskadının (Bach, 1988) başlatıcısı olan doku faktörü seviyesi hemofili hastalarında nispeten düşüktür (Brinkmann ve ark., 1994). Bununla birlikte eklemdeki trombin oluşumu, faktör VIII ve faktör IX'un önemli bir rol oynadığı iç tenaz kompleksine daha fazla bağımlıdır. Ayrıca eklemde trombin ile aktive edilebilen fibrinoliz inhibitörünün (TAFI) aktivasyonu için trombin üretimi gereklidir (Wyseure ve ark., 2018). Ağır hemofilide yetersiz TAFI aktivasyonu, hemofilik eklemde zaten artmış olan lokal fibrinolize ek olarak, ürokinaz tipi plazminojen aktivatör aracılı fibrinolize karşı korumayı bozmaktadır (Nieuwenhuizen ve ark., 2013).

Öte yandan, özellikle ilk eklem kanamasından sonra neovaskülarizasyon işlemi tetiklendiğinde, zengin şekilde vaskülarize olmuş sinoviyal dokuya zarar veren mekanik faktörler, risk oluşturabilir (Mulder ve ark., 2004).

Hemofili kanamasından sıklıkla etkilenen dokular eklemler ve kaslardır (Şekil 1.2). Hemartroz ve kas kanamasının yanı sıra, atakların %5 ila %10'u diğer majör kanamalardan (örn. Mukoza zarları ve gastrointestinal) oluşur (Fischer ve ark., 2011).



Şekil 1.2. Hemofilide en çok kanayan dokular (Fischer ve ark., 2011).

Tekrarlayan eklem içi kanamalar, uzun vadede eklemden fonksiyon kaybı ve sakatlıklara neden olabilir. Altı ay içerisinde 3 veya daha fazla kanayan eklemler “hedef eklem” olarak tanımlanır (Türk Hematoloji Derneği. 2011).

Tekrarlayan kanama, eklemde şişmesine ve devam eden sinovit’e yol açar. Eklem astarının (sinoviyum) büyümesi, kanama olasılığı daha yüksek olan iltihaplı, vasküler ve kırılabilir bir dokuya yol açar. Daha fazla kanama kıkırdakı tahrip edebilir. Kıkırdak yıkımı, uzun süreli eklem hasarına yol açar, bu da artrit ve sertleşmiş eklemlerle sonuçlanır (Luck ve ark., 2004).

Daha sonraki aşamalarda, kıkırdak tamamen kaybı olur ve kemik deforme olabilir, bu da eklemde şekli değiştirir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Hemofilide eklem tutulumu (Lafeber ve ark., 2008; Luck ve ark., 2004).

Bu durum bilhassa hedef eklemlerde daha hızlı gerçekleşen bir süreçtir. Bundan ötürü de kronik artropatiye neden olur. Bu hastalarda, eğer gerekli tedbirler alınmaz ise bu durum eklem hareket açıklığının azalması veya tamamen yok olması ile (ankiloz) sonuçlanabilir ve kalıcı sakatlıklar meydana gelebilir (Lafeber ve ark., 2008). Tüm bu nedenlerle hemofilik artropatinin önlenmesi hemofili hastalarının eklem sağlığının korunmasında oldukça önemli bir role sahiptir.

1.9. Hemofilik Artropatide Anjiogenez Faktörleri

Hemofilide genel olarak, kanama eğilimi pıhtılaşma faktörü seviyesi ile ters orantılıdır, bu nedenle kanama, esas olarak ağır hemofili hastalarında görülür (Srivastava ve ark., 2013). Son zamanlarda, ağır hemofilinin arkasındaki mekanizmalar nispeten belirsiz kalmıştır, ancak inflamatuvar sürece ve neoanjiyogenezin varlığına odaklanan yeni bulgular anjiogenez üzerine ilgiyi artırmaktadır (Acharya, 2012).

Eklem içine kanama, hemoglobinden demir salınmasına neden olur ve histolojik olarak hemosiderin birikintileri olarak tespit edilebilir. Demir, hemofilinin ortaya çıkmasında merkezi bir role sahiptir ve hidrolitik enzimlerin sinoviyal hücrelerden proliferasyonunu ve salınmasını tetiklediği gösterilmiştir. Demir, sinovyal hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu düzenler ve sinovyal proliferasyon ve aktif sinoviti indükler. Histolojik olarak sinovit, villusların hipertrofisi, enflamatuvar hücrelerin akışı ve yüksek derecede vaskülarizasyon ile karakterizedir (Roosendaal ve ark., 2006; Øvlisen ve ark., 2009; Acharya, 2012).

Hemofili hastalarında patolojik süreç kanama durduktan sonra da devam etmektedir. Çünkü eklem boşluğuna kan akışı inflamatuvar süreç ve sinovite neden olduğu bilinmektedir (Franchini ve ark., 2013). Bu nedenle, eklem içi kanamalar ve hemofilik artropati gelişiminin uzun vadeli etkilerinin patofizyolojik nedenlerinden biri olarak anjiyogenez oluşumu gösterilebilir. Buna ek olarak, çeşitli inflamatuvar faktörler erken dönemde eklem kanamalarında rol oynadığı bilinmektedir (Valentino, 2010). Anjiyogenez, iltihaplanma, malignite ve hipoksiye karşı vücudun oluşturduğu fizyolojik bir yanıttır. Bu durum büyüme faktörleri, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, hücre dışı matris molekülleri, matrisi parçalayan proteolitik enzimler, hücrel adhezyon molekülleri gibi birçok faktörün aracılık ettiği bir süreçtir (Szekanecz ve ark., 2001). Araştırmalar anjiyogenez ile kronik sinovit gelişimi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir.

1.9.1. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenez enflamasyon, metabolik stres ve hipoksiye bir yanıt olarak ortaya çıkan veya tümör hücreleri tarafından da indüklenebilen sıkı kontrol altında düzenlenmiş bir süreçtir. “Anjiyojenik anahtar” olarak adlandırılan endotel proliferasyonu için bir başlangıç noktası, pozitif ve negatif anjiyojenik düzenleyiciler arasındaki dengeyle kontrol edilmektedir (Nadar ve ark., 2005). Bu süreçte; büyüme faktörleri, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, hücre dışı matriks molekülleri, matriksi parçalayan proteolitik enzimler, hücrel adhezyon molekülleri ve bunlarla beraber çeşitli faktörler aracılık edebilir (Szekanecz ve ark., 2001).

Faktör IX eksikliği olan hemofilik farelerde yapılan deneysel çalışmalarda, yara oluştuktan günler sonra gecikmiş yara iyileşmesi, deri altı hematoma oluşumu ve yara bölgesinde artmış anjiyogenez saptanmış ve hemofilinin patogeneğinde anjiyogenezin önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, hemofilik artropatide neovaskülarizasyonun önemli bir özellik olduğu bildirilmiştir (Forsyth ve ark., 2012).

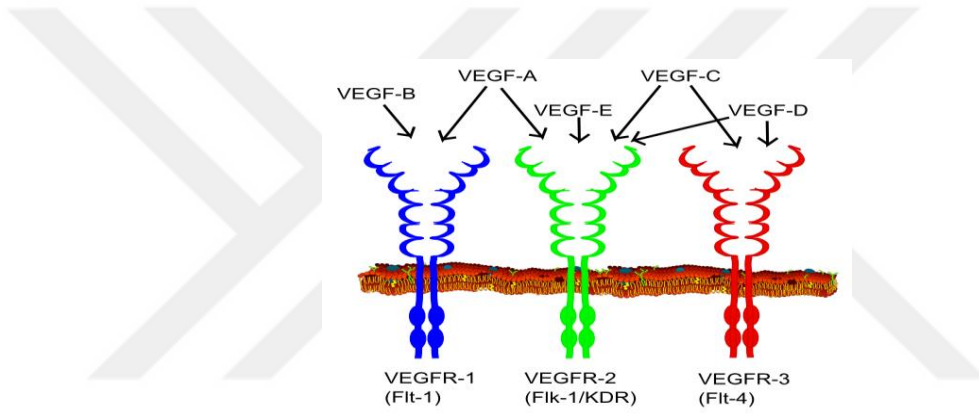
VEGF ve PDGF, sitokinlere bağı kıkırdak yıkımını ve büyüme faktörü aktivitesi ile ilişkili sentetik hücre tepkilerini destekleyerek, potansiyel olarak inflamatuvar eklem hastalığının gelişiminde rol oynar. İnflamatuvar eklem hastalığı olan kişilerde VEGF ekspresyonu artar. Poliartritli bireyler arasında, artan VEGF ve Ang-1 konsantrasyonlarının kemik yıkımı ile ilişkili inflamatuvar belirtiçler olduğu bulunmuştur. Buna dayanarak VEGF'nin, hemofilik artropatide rol oynayabileceği bildirilmiştir (Valentino, 2010).

Yeni damarların oluşumunu engelleyici bir şekilde çalışan çeşitli faktörler vardır. Bunlar arasında lösemi inhibitör faktör (LIF) ve interlökin ve interferonların farklı tipleri gibi çeşitli sitokinler yer almaktadır. Bunun yanı sıra neovaskülarizasyonu negatif yönde etkileyen metalloproteinazın doku inhibitörü (TIMPS), plazminojen aktivatör inhibitörleri (PAI'ler) ve trombospondin-1 (TSP-1) gibi proteaz inhibitörleri de bulunmaktadır (Lainer-Carr ve ark., 2007; Szekanecz ve ark., 2007). Anjiyogenez açısından en önemli büyüme faktörlerinden biri VEGF'dir. HIF-1, VEGF'de artış yönünde düzenleme yaparak etki etmektedir (Giatromanolaki ve ark., 2003; Taylor ve ark., 2005). Ayrıca, prostaglandin ve NO, neovaskülarizasyonda VEGF yoluyla etki etmektedir. VEGF ve Anjiotensin-1 (Ang-1) arasında, yeni oluşan damarlanmayı koruma amaçlı stabilizasyon sağlayarak etki eden bir düzenleme vardır. Ang-2, Ang-1'in tersine neovaskülarizasyon üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (Agapidou ve ark., 2016).

VEGF-A ya da VEGF-1 olarak da bilinen VEGF, insanlarda beş mRNA varyantı (izoformlar 121, 145, 165, 189 ve 206) olarak bulunur (Hutchings ve ark., 2003). VEGF, PDGF'nin A ve B zincirleri ile önemli benzerliği olan disülfür bağı alt birimler içeren heparin bağlayıcı bir dimerik glikoproteindir (Tischer ve ark., 1989). VEGF 121 tamamen çözünür bir proteindir ve ekstraselüler matrikse bağı değildir. VEGF 165, orta düzeyde çözünür ve bir şekilde ekstraselüler matrikse bağlanır. VEGF 189, neredeyse tamamen ekstraselüler matrikse ve hücre yüzeyine bağlanır (Ferrara ve ark., 1992; Houck ve ark., 1992). VEGF 165, insan DNA'sında ağırlıklı olarak sentezlenen izoformdur ve biyoyararlanım ve biyolojik gücü en

optimal olanıdır. Hem gelişimsel hem de patolojik retinal anjiyogenez için kritik izoformdur (Houck ve ark., 1992; Carmeliet ve ark., 1999; Stalmans ve ark., 2002).

Diğer iki vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF-B ve VEGF-C) VEGF'nin yapısal homojenitesine sahiptir ve VEGF-D'de olduğu gibi tümör anjiyogenezinde ve lenfatik sistemin gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Salven ve ark., 1998). VEGF-2 olarak da bilinen VEGF-C'nin, tavşanda oluşturulan iskemik bacak modelinde anjiyogenezi uyardığı gösterilmiştir (Witzenbichler ve ark., 1998). VEGF-E, birincil olarak VEGF reseptörü-2 aracılığı ile VEGF-A'ya benzer anjiyogenez aktiviteye sahiptir (Meyer ve ark., 1999).



Şekil 1.4. VEGF'in hücre membranında gösterilmesi (Takahashi ve ark., 2011).

VEGF ilk olarak tümör modellerinde bir vazopermeabilite faktörü ve hipoksi ile up-regüle edilen anjiyogenezin başlatıcısı olarak tanımlanmıştır. En güçlü endotelial hücre mitojeni oluşumuna ek olarak VEGF'nin, kılcal damar oluşumu için gerekli hücre dışı proteolizde önemli olan, mikrovasküler endotel hücrelerinde plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Pepper ve ark., 1991). VEGF, hücre migrasyonunda önemli olan endotel hücre $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ integrinlerinin salınımını uyarır (Senger ve ark., 1997).

VEGF'nin monositler ve makrofajlar tarafından salınarak neoanjiyogenez ile yeni damarların oluşumunu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca yaralanma bölgelerinde trombositlerin aktivasyonundan sonra VEGF salınarak yeni damar oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Lakka Klement ve ark., 2009).

Pro-anjiyojenik faktörlerin (VEGF-A gibi) stimülasyonu ile, önceden var olan damarlardaki endotel hücreleri aktive olur, çoğalır ve nihayetinde yeni damarlar oluşturmak için birleşen damar filizlerini oluşturur (Acharya ve ark., 2012). Yeni oluşan damarlar kırılgandır, sızdırır ve kolayca kanar. PDGF'nin etkisiyle perisitler, yeni oluşan damarlara göç eder ve sabitleştirici bir kaplama oluşturur. Perisitler mezenkimal kökenli perivasküler hücrelerdir. Damar stabilizasyonu ve hemostazın sürdürülmesi için hayati önem taşıyan yerel düzenleyici hücreler oldukları bilinmektedir. Perisitler, bazal membrana gömülüdür ve endotelial hücreler ile yakın temas halindedir. Perisitlerin varlığı, damarların gelişiminde vasküler olgunlaşmanın bir işareti olarak düşünülmektedir (Barlow ve ark., 2013).

Tattersall ve ark. (2016) tarafından makrofajların anjiyogenez ile, endotel tomurcuklarının sayısını ve uzunluğunu artırdığı gözlemlenmiştir, bu “anjiyotrofizm” adı verilen bir özelliktir. Proinflamatuvar bir şekilde polarize makrofajlar damar tomurcuklarının anjiyotrofik uyarımını artırabilir. Bu artışın makrofaj Notch sinyallemesine bağlı olduğu bulunmuştur. Notch sinyal yolağının ise organ oluşumunda rol oynayarak farklılaşmayı, çoğalmayı ve bunlarla birlikte apoptozu da etkilediği bilinmektedir. VEGF sinyalinin modülasyonu, Notch sinyal yolunun ana downstream (aşağı akış) efektörü özelliğindedir (Hellström ve ark., 2007).

Yapılan başka bir çalışmada ise kanamaya yatkın kırılgan damarlar ile sonuçlanan, azalmış perisit ile birlikte artmış bir mikrovasküler yoğunluk bulmayı bekleyen hemofilili hastaların eklemlerinde anjiyogenezin olup olmadığı araştırılmıştır. Araştırmada artroplastik endike olduğunda sadece hemolitik artropatinin geç evresinde sinovyal dokudan alınan sinovyal hücrelerde, mikrovasküller dansite ve VEGF ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (Zetterberg ve ark., 2014).

Ayrıca hemofilili hastalarda sinovyal dokusunda artmış VEGF-A ekspresyonu gözlemlenmiştir (Acharya ve ark., 2011). Çalışmalarında, erken eklem hastalığı olan hastalarda (hayat boyu ≤ 20 kez hemartroz gelişen olgular), ilerlemiş eklem hastalığı ($20 <$ den fazla hemartroz gelişen olgular) olan hastalara kıyasla

plazma VEGF-A seviyeleri önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, sinovyumdaki monosit ve makrofaj bağından hücrelerin varlığı da gösterilmiş olup; VEGF'nin artışı ile de bu hücrelerin neoanjiyogenezde bir rol oynadığı ortaya konulmuştur (Acharya ve ark., 2011).

1.9.2. İnterlökin-4 (IL-4)

1.9.2.1. IL-4 Özellikleri ve Sinyal Yolları

IL-4, glikolizasyon düzeyine bağlı olarak 15-20 kDa moleküler ağırlığa sahip 129 amino asit kalıntısından oluşan, post-translasyonel yapıda, ek olarak üç disülfür bağının varlığıyla stabilize edilen bir glikoproteindir (Banchereau ve ark., 1994). Heterodimerleri oluşturan IL-4'ü (IL-4R) bağlayan iki tip membran reseptörü vardır ve bunlar yapısal olarak üç reseptör zincirinin ikisinin bir kombinasyonudur (Mueller ve ark., 2002).

Tip I sinyal kompleksi, IL-4R α / Janus Kinaz 1 (JAK1) / Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT3) / STAT6 kademeli fosforilasyonu yoluyla hücre içi sinyal transferine katkıda bulunur (Jiang ve ark., 2000; Bhattacharjee ve ark., 2013). Tip II sinyal kompleksinin aktivasyonu, IL-4R α / JAK2 / STAT3 kaskadının ve ayrıca ikinci tip reseptörün IL-13 ile bağlanması durumunda IL-13R α 1 / Tirozin Kinaz 2 (TYK2) / STAT1 / STAT6 kaskadının tetiklenmesi ile ilişkilidir (Jiang ve ark., 2000; Bhattacharjee ve ark., 2013). IL-4'ün biyolojik aktivitesini bağlayan ve inhibe eden çözülebilir bir reseptör (sIL-4R) formu da vardır (Renz, 1999).

1.9.2.2. IL-4'ün Eklem Dokusundaki Biyolojik İşlevi

IL-4, esas olarak eklem sinoviyal membranına kan damarları yoluyla sızan T-helper 2 (Th2) lenfositleri tarafından üretilir (Ishii ve ark., 2002). IL-4, Osteoartritin ileri evresindeki hastalarda MMP sekresyonunu inhibe ederek eklem kıkırdığının

proteoglikanlarının degradasyonunu bloke eden, güçlü kırıkta koruyucu özelliklere sahip bir sitokindir (Baek ve ark., 2018). IL-4 ayrıca, kondrositler ve fibroblastlar yoluyla Fosfolipaz A2 (PGE2), siklooksijenaz-2 (COX-2), PLA2 ve iNOS gibi enflamatuar aracılardan sentezini de inhibe eder (Alaaeddine ve ark., 1999; Yorimitsu ve ark., 2008; Baek ve ark., 2018).

Bunun yanı sıra IL-4'e maruz bırakılan fibroblast ve kondrosit kültürlerinde, IL-1 β , TNF α ve IL-6 gibi enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda bir azalma saptanmıştır (Schuerwegh ve ark., 2003). Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında da rekombinant murin IL-4 (rmIL-4) uygulanan kolajenle indüklenen artritli farelerde, sinoviyal membran ve eklem kırıktağının iltihaplanmasında önemli bir azalma bildirilmiştir (Fu ve ark., 2014). Bu farelerden alınan makrofajların, kontrol grubuna kıyasla IL-1 β ve TNF α seviyelerinde azalma olduğu saptanmıştır.

1.9.2.3. Hemofilik Artropatinin Patogenezinde IL-4'ün Rolü

Hemofilik artropati patogenezi üzerine yapılan çalışmalar, IL-4'ün anti-enflamatuar ve kondroprotektif rolünü ve ayrıca hastalık gelişiminde bir azalmayı doğrulamaktadır. IL-4 ve diğer anti-inflamatuar sitokinlerin kan damarlarının patolojik büyümesi ve geçirgenliğinin sınırlandırılması sayesinde hemofilik artropati seyrinde inflammatuar ve dejeneratif süreçlerin korunmasına ve azaltılmasına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Wyseure ve ark., 2016). Bununla birlikte IL-4 eksikliğinin, hemofilik artropati hastalarının eklemlerinde yıkıcı lezyonların gelişimine yönelik eğilimi arttırdığı gösterilmiştir (Mofid ve ark., 2015).

Mezenkimal kök hücrelerin (MSC) hemartrozlu tavşan eklemleri üzerindeki terapötik etkisinin analiz edildiği bir başka çalışmada ise, araştırma grubu hayvanlarının sinoviyal membranında, IL-4'ün artmış ekspresyonu ile birlikte azalmış IL-1 β , TNF α seviyeleri ve azalmış dejeneratif bulgular raporlanmıştır. Sağlıklı eklemlerin korunmasının sürekli IL-4 varlığını gerektirdiği ve IL-4 ekspresyonundaki azalmanın artropati ile ilişkili enflamatuar değişikliklerin

artışı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bu durumda MSC kullanımı, hemofilik artrit hastalarında umut verici bir terapötik seçenek gibi görünmektedir (Rodriguez-Merchan, 2016).

Silveira ve ark. (2015)'nin yaptığı bir çalışmada anti-FVIII'li hastaların periferik kanındaki IL-4-pozitif hücrelerin aktivitesinde değişiklikler bildirilmiştir. Bu hastaların, anti-FVIII olmayan hemofilik artrit hastalarının periferik kanından izole edilen analog hücrelere kıyasla CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinde daha düşük IL-4 seviyesine sahip oldukları tespit edilmiştir. B hücreleri açısından da benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Bununla birlikte, anti-FVIII varlığı ile azalmış IL-4 ekspresyonu arasında bir korelasyon saptanmış ve, hemofilik artrit hastalarında azalmış IL-4'ün kötüleşmiş prognoz için bir gösterge olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Silveira ve ark., 2015).

1.9.3. İnterlökin-12 (IL-12)

IL-12'nin inflamatuvar süreçteki en önemli rolü, patojenlere karşı doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri arasında bir köprü görevi görmektir. IL-12, dentrit hücreler, monositler ve makrofajlar, nötrofiller tarafından yapılır ve, T hücreleri ve NK hücreleri tarafından salgılanan reseptörlere bağlanır. IL-12'nin bağlanması, makrofajların bakterisidal aktivitesini düzenleyen ve yardımcı T-1 (Th1) hücrelerinin salgıladığı sitokinlerin üretimini daha da artıran IFN- γ üretimini ve salımını uyarır. Ek olarak IL-12, antijen kaynaklı apoptoza karşı direnci artıran ve IFN- γ üreten hücrelerin çoğalmasını artıran, immatür T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını sağlar. IL-12'nin hücrel bağışıklık tepkisinin artırmasındaki rolü, hücre içi patojenlere karşı savunma için gereklidir.

IL-12, farklı genler tarafından kodlanan iki alt birimden (p35 ve p40) oluşan bir heterodimerdir (Vignali ve ark., 2012). P40 alt birimi IL-12 reseptörüne

bağlanmaya aracılık ederken, p35 alt birimi sinyal transdüksiyonu için gereklidir. P40 alt birimi, aynı zamanda, IL-12 reseptörüne eşit afinite ile ancak hücrel bir etki ortaya çıkarmadan bağlanan homodimerler oluşturabilir. Homodimerler, IL-12'nin etkilerini kontrol etmeye yardımcı olabilir. P35 ve p40 alt birimlerinin sentezi bağımsız olarak düzenlenir. Belirli bir uyarana yanıt olarak hücreler, heterodimerden 10-100 kat daha fazla homodimer salgılar. IL-12, bakterilere ve bakteriyel ürünlere, hücre içi patojenlere ve virüslere yanıt olarak fagositik hücreler (örneğin, monositler ve makrofajlar) tarafından üretilir. IL-12 reseptörü, gp130 sitokin reseptörü üst ailesinin bir üyesidir.

IL-12 reseptörü iki alt birimden oluşur ve her ikisinin de sinyal iletimi için etkinleştirilmesi gerekir. IL-12'nin temel hücrel hedefleri, T hücreleri ve NK hücreleridir. IL-12, interferon (IFN- γ) üretimini indükler, proliferasyonu uyarır ve sitotoksiteyi artırır. IL-12 ve IFN- γ anjiyogeneze etkili olduğu proliferasyon mekanizması üzerinden etkisini göstermektedir (Vignali ve ark., 2012).

1.9.4. İnterferon Alfa (IFN- α)

IFN- α , antiviral, antiproliferatif, immünomodülatör ve antianjiyogenik aktiviteleri içeren bir sitokindir. Klinik çalışmalar, IFN- α tedavisinin kaposi sarkomu ve hemanjiyomlar gibi anjiyoproliferatif hastalıklarda etkileyici tepkiler oluşturabileceğini göstermektedir (Guttermann ve ark., 1994).

Transplante edilebilir tümör modellerinde belirgin terapötik aktiviteye sahip bir sitokin olan interferon-alfa (IFN- α), güçlü bir anjiyogeneze inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Stefano, 2009). IFN- α 'nın vaskülatürite üzerindeki etkileri temel olarak tümör hücreleri tarafından fibroblast büyüme faktörü üretimi veya IL-8 ve vasküler endotelial büyüme faktörü geninin aşağı (down) regülasyonu ile ifade edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, IFN- α 'nın endotel hücrelerin proliferasyonu ve hücre göçü üzerinde direkt olarak etkisi olduğu gösterilmiştir. IFN- α 'nın anti-anjiyogenik etkilerinin, subkutan ksenograft modellerinde artan hipoksi ve iskemik nekroz ile ilişkili olduğu görülürken, transgenik fare modellerinde IFN- α , hem kan damarlarına hem de tümör hücresi proliferasyonuna aynı anda müdahale ederek tümörlerin nekroz olmadan gerilemesine neden olduğu gösterilmiştir (Indraccolo ve ark., 2007).

IFN- α 'nın, VEGF gen transkripsiyonu ve tümör anjiyogenezi üzerindeki yapılan çalışmalarda ise, nöroendokrin tümörlü hastalarda, IFN- α tedavisinden sonra karaciğer metastazı biyopsi materyalinde VEGF plazma seviyeleri daha düşük bulunmuş ve VEGF mRNA seviyeleri ve mikrodamar yoğunluğu azaldığı gösterilmiştir (Marschall ve ark., 2003).

1.9.5. İnterferon Gama (IFN- γ)

IFN- γ ; TNF, ve Interlokin hücelere yanıt olarak NK hücreleri, tip 1 T yardımcı (Th) hücreleri ve sitotoksik T hücreleri (CD8⁺) tarafından üretilir. IFN- γ reseptörünün iki alt birimi vardır; biri molekülün bağlanmasından, diğeri sinyal iletiminden sorumludur. IFN- γ , sınıf II histo-uyumluluk antijenlerini (Klas 2 HLA antijenleri) indüklemekte ve makrofajları aktive etmektedir. Diğer fonksiyonların yanı sıra hücre içi patojenlere karşı konak savunması için de önemlidir. IFN γ ayrıca, endotel aktivasyonunu artırarak anjiyogenezi desteklemektedir (Cooper ve ark., 1993; Huang ve ark., 1993).

Yapılan deneylerde IFN- γ , VEGF-A ve sVEGF-R1 ekspresyonunu düzenleyerek insan korneasında anti-anjiyogenik sitokin görevi gördüğü gösterilmiştir (Kommineni ve ark., 2008).

Adaptif bağışıklık hücreleri arasında, CD8⁺ CTL'ler tarafından IFN- γ salgılanmasının, tümör anjiyogenezinin baskılanmasında kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir . Farelerle yapılan deneylerde efektör T hücreleri tarafından aynı anda üretilen IFN- γ ve TNF, birlikte tümör kan damarları üzerinde güçlü bir etkiye sahip

olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, tümörlerde IFN- γ tarafından indüklenen erken olayların, gelişim, yara iyileşmesi, yumurtalık döngüsü ve gebeliğe bağlı uterus vasküler yeniden şekillenmesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir (Kammertoens ve ark., 2017).

IFN- γ 'nın başlıca fonksiyonları özet halinde Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. İnterferon gama'nın başlıca fonksiyonları (Cooper ve ark., 1993; Huang ve ark., 1993).

-
- Makrofaj mikrobisidal aktivitesini artırır.
 - Enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını uyarır.
 - Viral olmayan hücre içi patojenlere karşı konakçı hücre direncini artırır.
 - Fagositler üzerindeki yüzey Fc reseptörlerini ve sınıf II majör histo-uyumluluk kompleks antijenlerini artırır.
 - Makrofaj migrasyonunu engeller.
 - Dev hücrelerin oluşumunu uyarır.
 - Miyelosupresyona neden olur.
 - Olgun nötrofillerin işleyişini artırır.
 - Sitolitik T hücrelerinin, NK hücrelerin ve lenfosit ile aktive olan öldürücü hücrelerin farklılaşmasını sağlar.
 - Endotel hücrelerini aktive eder.
-

1.9.6. İnsan Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1)

PAI-1, serin proteaz inhibitörü olup, (serpin) ailesinden bir üyedir. PAI-1, hem doku tipi, hem de ürokinaz plazminojen aktivasyonuna karşı inhibe edici etkisi ile, downstream (aşağı akış) plazmin oluşumunun en önemli fizyolojik düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Carmeliet ve ark., 1993). Ayrıca, yapılan çalışmalarda PAI-1'in hücre yapışması, ayrılması ve göçü üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Cao ve ark., 2006).

Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI)'ın anjiyogenez sırasında hem proteolitik aktivite hem de hücre göçü üzerinde etkisi vardır ve tümör oluşumunda rol oynamaktadır (Leik ve ark., 2006).

Kandaki plazminojen aktivasyonunun birincil fizyolojik inhibitörü olan PAI-1 ve t-PA'yı hedefler PAI-1'in konjenital eksikliği nadir olup, homozigot bireylerde travmaya yanıt olarak anormal kanama görülür (Dieval ve ark., 1991, Minowa ve ark., 1999).

Normal popülasyonda, plazma PAI-1 konsantrasyonları 15 katlık bir aralıkta değişir (6-80 ng / mL; ortalama, 10 ng / mL [0,2 nmol / L]) (Declerck ve ark., 1988) ve sirkadiyen varyasyonlar sergiler (Wiman ve ark., 1990). Bu değişkenliğin bir kısmı PAI-1 genindeki polimorfizmlerden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, değişkenliğin büyük bir kısmının, PAI-1 gen ekspresyonunun çok çeşitli fizyolojik etkilere, koşullara ve ayrıca farmakolojik ajanlara tepkiselliğinden kaynaklandığı görülmektedir (Colman, 2006). Daha yüksek plazma PAI-1 seviyelerinin, plazminojen aktivatörlerinin işlevsel ömrünü kısaltarak fibrinolizi geciktirdiği ve bu sayede anjiogenezi desteklediği bildirilmiştir (Huber, 2001). Ayrıca, PAI-1'in anjiyogenez yoluyla tümör büyümesini düzenlediği yapılan in vivo deneylerde gösterilmiştir (Stefansson ve ark., 2001).

1.9.7. İnsan Trombospondin-1

Trombospondinler (TSP'ler), yüksek moleküler kütle ile salgılanan glikoproteinlerin bir ailesidir Ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri ve glikozaminoglikanlar ve kalsiyuma bağımlı hücre bağlanmasının desteklenmesinde görev alırlar. Buna ek olarak, hücre yayılmasının indüksiyonu, hücre migrasyonu, fokal yapışıklıkların sökülmesi, hücreye bağlı uyarım veya inhibisyon, hücre çoğalması veya apoptoz, nöronal hücreler tarafından sinaptogenez ve vaskülerde nitrik oksit sinyalleme sinin antagonizmi gibi pek çok oluşumda rol oynadıkları bilinmektedir (Adams ve ark., 2011).

Ailenin üyelerinden TSP1 ve TSP2, moleküler olarak yüksek miktarda birbirine benzemekte olup 450-kDa homotrimerler oluşturur. Hem TSP1, hem de TSP2, kıkırdak oluşumu sırasında mezenkimal hücreler ve kondrositler tarafından

eksprese edilir. Osteoblastlar mineralleştirici kıkırdağın yerini aldıkça, kondrositlerde TSP2 ekspresyonu azalır ve kemikleşen alanlardaki matrikste artar. TSP1 ve TSP2, güçlü antianjiyojenik faktörlerdir ve bu nedenle, kemik oluşumunda kan damarı organizasyonunu kontrol etmede de rol oynamaktadır (Park ve ark., 2004; Burr ve ark., 2012).



Şekil 1.5. TSP1'in moleküler yapısı (Morris ve ark., 2014).

1.9.8. Anjiopoetin-1 (Ang-1)

Anjiopoetin, embriyonik ve postnatal anjiyogenezde rol oynayan vasküler büyüme faktörleri ailesinin bir parçasıdır. Anjiopoetin sitokinleri, damarları çevreleyen düz kas hücrelerine sinyal göndererek mikrovasküler geçirgenlik, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyonu kontrol etmede rol oynamaktadır (Scott ve ark., 2010).

Anjiopoetin-1 (Ang-1), vasküler destek hücreleri, böbrekteki özel perisitler ve karaciğerdeki hepatik stellat hücreleri tarafından üretilen bir büyüme faktörüdür. Bu büyüme faktörü aynı zamanda bir glikoproteindir ve endotel hücrelerinde bulunan tirozin reseptörü için bir agonist işlevi görür (Jeansson ve ark., 2011). Diğer bir deyişle, Ang-1, perivasküler hücreler tarafından eksprese edilen bir endotelyum spesifik reseptör tirozin kinaz (Tie2) agonistidir ve Ang-1 eksikliği olan fareler, Tie2 eksikliği olan farelerde gözlenenlere çok benzeyen vasküler kusurlara sahiptir (Suri ve ark., 1996). Anjiopoetin-1 ve tirozin kinaz sinyali, kan damarı gelişimini ve olgun damarların stabilitesini düzenlemek için gereklidir (Jeansson ve ark., 2011).

Ang1/Tie2 sinyalinin, örneğin endotel hücrenin hayatta kalmasını teşvik ederek ve kan damarı geçirgenliğini azaltarak, kan damarı olgunlaşması ve stabilizasyonu için önemli olduğuna inanılmaktadır.

Bunun yanında, poliartritli bireyler arasında, VEGF ve reseptörü Ang-1 konsantrasyonlarının, inflamatuvar belirteçler ve kemik yıkımı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Anjiyogenez esas olarak kemik iliğinde ve vasküler kök hücrelerde gerçekleşir. VEGF, Ang-1, Ang-2 ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi anjiyogenetik faktörler, endotel hücre proliferasyonuna katılır (Carbajo- Lazoya ve ark., 2012).

Serum VEGF, tirozin kinaz inhibitörleri ve Ang-1 konsantrasyonlarının, inflamasyon parametreleri ve erken artritte kemik yıkımı ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, anjiyogenezin hastalık şiddetini yansıttığını ve anjiyogenez biyo-belirteçlerinin hastalık aktivitesini değerlendirmek ve inflamatuvar artritli hastalar için sonucu tahmin etmek için yeni bir faydalı araç olabileceğini göstermeye katkıda bulunmaktadır (Gaëlle Clavel ve ark., 2007).

Ang-1 ve Ang-2 koagülasyon kaskadında trombomodulin olarak rol oynar ve endotel hücrelerde koagülasyon regülatörü olarak görev alır (Daly ve ark., 2017).

1.9.9. Anjiopoietin-2 (Ang-2)

Anjiopoietin-2, embriyonik ve postnatal anjiyogenezde rol oynayan vasküler büyüme faktörleri ailesinin bir parçası olup, insanlarda ANGPT2 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Hem ANGPT1 hem de Tie2 için doğal olarak oluşan antagonist; Ang-1'e benzer şekilde sadece vasküler yeniden şekillenme bölgelerinde ifade edilir (Cheung ve ark., 1998).

Ang-2, VEGF'ye bağlı anjiyogenezin hızlandırıcısı olarak işlev görür ve anjiopoietin-1/Tie2 yolunun bir antagonist sitokindir. Anjiopoietin ligandları

(Ang1–Ang4) ve Tie (Tie1 ve Tie2) reseptörü tirozin kinazlar, embriyonik kardiyovasküler ve lenfatik gelişim için gerekli olan bir endotelial sinyal yolu oluşturur. Yetişkinlerde, bu sistem vasküler homeostazı düzenler ve damar geçirgenliğini, inflamasyonu ve anjiyogenik tepkileri kontrol eder (Scholz ve ark., 2015).

Ang-2, endotel hücre fizyolojisi için hayati öneme sahiptir ve endotelial geçirgenliği ve anjiyogenik fonksiyonları düzenleyerek vasküler hastalıklarda merkezi bir rol oynamaktadır (Akwii ve ark., 2019).

Ang-2, fizyolojik süreçlerde önemli rol oynar ve birçok hastalıkta düzensiz Ang-2 ekspresyonu görülür. Yapılan hayvan deneylerinde, Ang-2'nin Vasküler bozucu özelliği nedeni ile, Ang-2'yi aşırı eksprese eden transgenik farelerde, oluşturulmuş zayıf kan damarlarının embriyonik olarak fatal özellik gösterdiği bulunmuştur (Maisonpierre ve ark., 1997).

Dolaşımdaki artmış Ang-2 düzeyleri; melanom, renal hücreli karsinom, meme kanseri, ve glioblastoma da dahil olmak üzere birçok kanser tipinde rapor edilmiştir (Saharinen ve ark., 2017).

Anjiyogenez ve inflamasyon birbiriyle ilişkili iki durumdur ve Ang-2'nin kanser ile birlikte otoimmün hastalıklar, sepsis ve akut akciğer hasarı gibi durumlarda inflamasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Scholz ve ark., 2015). Ayrıca, Serum Ang-2 düzeylerinin, yüksek duyarlı C-reaktif protein ve beyaz kan hücresi sayımı gibi inflamatuvar biyobelirteçlerle pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir ve bu durum Ang-2'nin inflamatuvar bir belirteç olarak kabul edilebileceği fikrini doğurmuştur (Schuldt ve ark., 2018). Ang-1, damar olgunlaşması, göçü ve hayatta kalması için kritik öneme sahiptir. Ang-2 ise hücre ölümünü teşvik eder ve vaskülarizasyonu bozar. Diğer bir deyişle, Ang-1'in gelişen damarların stabilizasyonunu ve sıkılaşmasını desteklediği, Ang-2'nin ise Tie-2'nin Ang-1 tarafından aktivasyonunu bloke ederek vasküler destabilizasyonu indüklediği bildirilmiştir (Yoshiji ve ark., 2005).

1.9.10. Endoglin

Endoglin (ENG), hücre yüzeylerinde bulunan bir tip I membran glikoproteinidir ve TGF- β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü) reseptör kompleksinin bir parçasıdır. Kapsamlı çalışmalar, endoglinin TGF- β sinyal yolağını dengelemede ve endotelial hücre çoğalmasını ve göçünü düzenlemede önemli rol oynadığını göstermiştir (Schoonderwoerd ve ark., 2020). Endoglin, ayrıca fizyolojik ve patolojik olarak vasküler değişikliklerde görev alan önemli bir moleküldür. Endoglin eksikliği olan (knock-out) fareleri kullanan çalışmalar, endoglinin anjiyogenez ve vasküler yeniden modellenmesi (neovaskülarizasyon) üzerinde etki ettiğini göstermiştir (Haddow ve ark., 1999; Goumans ve ark., 2002).

Fizyolojik koşullar altında endoglin, endotel hücrelerinde nispeten düşük seviyelerde eksprese edilir; ancak vasküler hasara yanıt olarak anjiyogenez sırasında endoglin ekspresyonu artar (Botella ve ark., 2002; Jonker ve ark., 2002). Ayrıca endotelial hücrelerde endoglin ekspresyonu, enflamasyon sırasında da artar ve bu artış makrofajlar gibi enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile ilişkilidir (Torsney ve ark., 2002).

Son zamanlarda, endoglinin VEGF-A ile stimülasyonu üzerine erken endozomlarda VEGFR2 ile birlikte lokalize olduğu ve azalmış endoglin ekspresyonuna sahip endotelial hücrelerin, artan aktin (Akt) fosforilasyonu sergilediği gösterilmiştir (Jin ve ark., 2017). Akt yolağının aktivasyonunun, VEGF stimülasyonundan sonra adezyon molekülü salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2001). Muhtemelen bu etkiyi aktive transkript faktör-2 (ATF-2)'nin fosforilasyonunu azaltarak yaptığı düşünülmektedir (Kim ve ark., 2001). Bu nedenle, endoglin ekspresyonunun azalması, Akt'nin fosforilasyonunu artırarak VEGF-A ile indüklenen endotel aktivasyonunu ve ardından lökosit ekstravazasyonunu azaltabilir, böylece VCAM1'in ATF-2 ile indüklenen transkripsiyonunu down regüle edebilir.

Endoglin, başlangıçta insan endotel hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen bir glikoprotein-antijen olarak keşfedilmiştir (Gougos ve ark., 1988).

TGF β 1'in endotel hücrelerinde halihazırda TGFBR2'ye bağlanmış Aktivin A reseptör benzeri kinaz 1 (ACVRL1) ile etkileşimini kolaylaştırır (Cheifetz ve ark., 1992). Bu nedenle, endotelyal hücrelerin proliferasyonuna ve göçüne yol açan ACVRL1 sinyalleri ile proliferasyonu ve migrasyonu inhibe eden TGFBR1 sinyalleri arasındaki dengeyi belirler. Her iki reseptör de endotelyal hücrelerde eksprese edildiğinden, endoglin varlığı, ACVRL1 aracılı proliferatif ve invazif bir yanıtı destekleyerek, TGF beta yanıtını belirler. Yeni kan damarlarının oluşumunu (anjiyogenez) kolaylaştırır (Goumans ve ark., 2003; Lebrin ve ark., 2004). Kalıtsal fonksiyonel endoglin yokluğu, sızıntılı ve zayıf gelişmiş bir vasküler yatakla karakterize hemorajik telenjektazi tip-I (HHT1) bozukluğu ile ilişkilidir (McAllister ve ark., 1994). Bunun yanısıra endoglin angiogenezde bozukluk olduğu kanıtlanmış preeklampsii gibi gebeliğin hiper tansiyon hastalıklarında da rol oynamaktadır (Venkatesha ve ark., 2006).

Ayrıca, yapılan çalışmalarda endoglinin, VEGF ile indüklenen uç hücre oluşumunu desteklediği bildirilmiştir. Mekanik olarak endoglin, VEGF reseptörü (VEGFR)-2 ile VEGF'ye bağımlı bir şekilde etkileşime girerek, VEGFR2 'nin hücre yüzeyinde kalmasını sağlayıp ve bozulmasını önlemektedir. Fakat, VEGFR2 ile etkileşime girme yeteneğinden yoksun olan endoglin mutantlarının, hücre yüzeyinde VEGFR2'yi sürdürmede ve VEGF'nin neden olduğu uç hücre oluşumunu teşvik etmede başarısız olduğu gözlemlenmiştir (Tian ve ark., 2018).

Anjiogeneizde rol oynadığı kanıtlanmış olan endoglinin, hemofilik artropatide kanamaya bağlı prognostik bir role sahip olup olmadığı büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasının amacı da, endoglin ekspresyonun ve anjiyogenetik faktörlerin ilişkisinin irdelenerek, ilerde hemofilik artropatide potansiyel biyomarker olarak değerlendirilebilecek faktörlerin araştırılmasıdır. Böylece hemofili hastalarında bazı parametrelere önceden bakılarak, eklem sağlıklarının daha iyi yönetilmesi sağlanabilmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda hemofili tanısı almış hastalarda anjiyogenez ile ilişkili olduğu bilinen endoglin proteininin plazma ve gen ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir.

2.1. Çalışma Grubu

Bu kapsamda, 1 Mart 2019-1 Ekim 2019 tarih aralığında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Anabilim Dalı'nda rutin kontrolleri için polikliniğe başvuran gönüllülerden toplanan kan örneklerinde endoglin proteini ile, anjiyogenez ile ilişkili sitokinlerden VEGF, IL-4, TSP-1, IL-12, IFN- α , PAI-1, IFN- γ , ve ANG-1, ANG-2 sitokinlerinin plazma düzeyleri tayin edilmiştir. Çalışmada ayrıca, endoglin, HIF-1 α , PGE-2, VEGFA ve VEGFR1 mRNA düzeyleri saptanmıştır.

Çalışma kapsamında toplanan kan örneklerinden platelet izolasyonu da yapılarak, plateletlerin Annexin V bağlanma analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında hemofili hasta grubu için 30 örnek, sağlıklı kontrol grubu için ise 29 örnek toplanmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri şu şekildedir: 1 ile 18 yaşları arasında ağır (faktör aktivitesi $<1\%$) veya orta (faktör aktivitesi $1-5\%$) hemofili (hemofili A ve B) tanısı almış ve en az 4 ayda bir rutin takip muayenelerine katılan hastalar.

1 yaşından küçük veya 18 yaşından büyük hastalar, son 3 ay içinde kayıtlı radyolojik ve/veya klinik olarak kanıtlanmış eklem kanaması olan inhibitör pozitif hastalar, hastaneye yatış gerektirecek şekilde bir kanaması olanlar ve son 1 ay içinde majör ya da minör cerrahi girişim geçirmiş olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Bir hastanın kan örneğinde düşük titre inhibitör pozitifliği gözleendiğinden ve diğeri bir hastada da hafif hemofili olduğı için iki hasta daha sonra çalışmadan çıkarılmıştır. Çalışma grubunun (n=28) başvuru sırasındaki ortalama yaşı 8'dir. (ortalama $8,55 \pm 5,8$ yıl; dağılım 1-19 yıl).

Çalışmanın kontrol grubu ise; çoğı demir eksikliği ve B12 vitamini eksikliği anemisi tedavisi sonrası takipte olan, bilinen herhangi bir kanama diyatezi ya da enfeksiyon öyküsü olmayan ve gönüllü olarak fazladan kan örneğı vermeyi kabul eden, yaş ve cinsiyet açısından hemofili hasta grubu ile yakın seçilen 29 sağlıklı gönüllüden oluşturulmuştur.

Çalışma yerel etik kuruldan onay alınarak gerçekleştirilmiştir ve kayıt öncesi her katılımcıdan bilgilendirilmiş onam alınmıştır. Venöz kan örnekleri EDTA içeren tüplere alınarak kullanılmıştır.

2.2. Kullanılan Cihazlar

- Karıştırıcı vorteks (Heidolph),
- Derin dondurucu (-80°C) (Heto Ultra Freeze),
- Santrifüj (Sigma),
- Santrifüj (Beckman Coulter, Microfuge 18 Centrifuge)
- Spektrofotometre (Multiskan Go, Thermo Scientific)
- İnkübatörlü çalkalayıcı (BioSan, ES-20)
- Buz makinesi (Scotsman)
- Su banyosu (Daihan Scientific)
- Real Time PCR Cihazı (Qiagen)
- Muse Cell Analyzer (Millipore)

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Almanya)
- Human Endoglin Elisa Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-4 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IL-12 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human VEGF ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IFN- α ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human IFN- γ ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human TSP-1 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human PAI-1 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human ANG-1 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- Human ANG-2 ELISA Kit (Fine Test, Çin),
- RT² First Strand Kit (50)- For cDNA Synthesis Prior To Real-Time PCR (Qiagen, Almanya)
- Sybrgreen master mix (Qiagen, Almanya)
- Primerler (BT Lab, Türkiye)
- Annexin V Binding Assay Kit (Luminex, Almanya)

2.4. ELİSA Ölçümleri

ELİSA, özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanan, birden çok numuneyi aynı anda analiz etmeyi sağlayan, immunodiagnostik kantitatif bir analiz yöntemidir. ELISA yönteminin prensibi, enzim ile işaretli antikor (konjugat) ve substrat kullanılarak, saptanacak materyalde bulunan antijen veya antikor varlığının kantitatif olarak tespit edilmesine dayanmaktadır. (Engvall ve ark.,2010), (Sakamoto ve ark., 2018).

2.4.1. Plazma Endoglin Düzeyi Tayini

Bu deney, Human Endoglin Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Minimum saptanabilir doz 0,1 ng/ml'dir. Testin duyarlılığı, sıfırdan ayırt edilebilen en düşük protein konsantrasyonu olarak tanımlanmış olup saptama aralığı 0,16-10 ng/mL arasındadır. Test için varyasyon katsayısı (CV) %10'dan azdır.

2.4.1.1. Yöntemin Prensibi

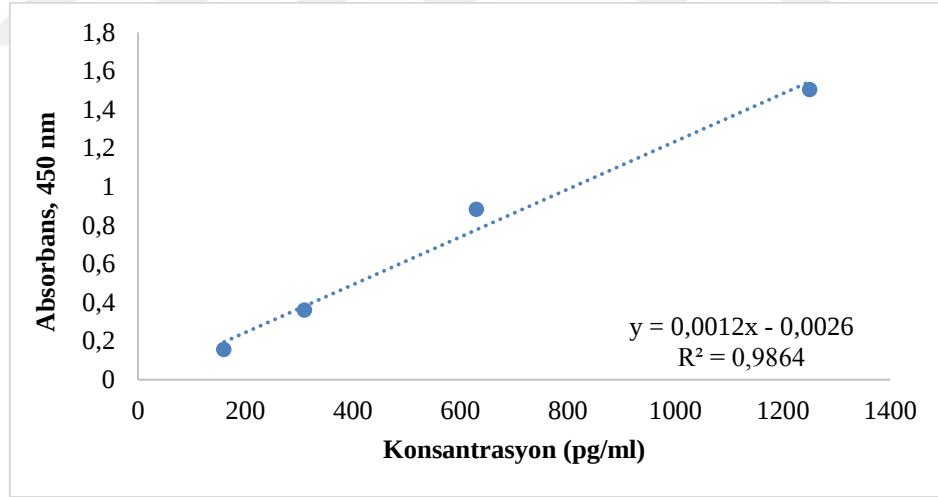
İnsan Endoglin seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi Endoglin spesifik antikoruna ile kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir. Enzim olarak Horseradish peroksidaz (HRP) enzimi kullanılmıştır. Biotin ile işaretlenmiş antikorların eklendiği plağın inkübasyon ve yıkanması sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. Tekrar inkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında TMB (tetrametilbenzidin) kromojen substratı eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilavesi ile yüksek pH'da enzim-protein aktivitesi inaktive edilerek, reaksiyon sonlandırılır. Konsantrasyona bağlı olarak oluşan renk şiddeti değişiklik göstermektedir.

2.4.1.2. Yöntemin Uygulanışı

Standart ve test numuneleri (1/2 oranında seyreltilmiş) için gerekli kuyucuk sayısı belirlendi. Standart, numune ve kontrol (kör) çözeltileri kuyulara konulmadan önce plak 2 kez yıkandı. Standart ve kör kuyucuklarına sırasıyla 100'er µL çözeltileri eklendi. Örnek kuyucuklarına 1/2 oranında dilüe edilmiş çözeltiden 100 µL eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 90 dakika 37°C inkübe edildi. Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Standart, örnek ve kör kuyucuklarına 100 µL Biotin işaretli

antikor çalışma çözeltisinden ilave edildi. Plağın üstü koruyucu membran ile kapatıldı ve 60 dakika 37°C inkübe edildi. Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucukların içerisinde 1-2 dakika bekletildi. Her kuyucuğa 100 µL HRP-Streptavidin konjugatı (SABC) çalışma solüsyonu eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı ve 30 dakika 37°C inkübe edildi. Belirtilmiş süre sonunda plağın koruyucu membranı kaldırıldı, plak 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her defasında yıkama solüsyonu kuyucuklarda 1-2 dakika bekletildi. Her kuyucuğa 90 µL TMB Substratı eklendi. Plağın üzeri koruyucu membran ile kapatıldı, karanlıkta 15-20 dakika 37°C inkübe edilerek, her kuyucuğun içerisine 50 µL durdurma (stop) solüsyonu eklendi.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve kalibrasyon grafiği çizilerek plazma endoglin düzeyi hesaplandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Endoglin ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.2. Plazma IL-4 Düzeyi Tayini

Bu deney, Human IL-4 ELİSA Kit (Fine Test) kullanılarak yapılmıştır. Plazma İnterlökin-4 (IL-4) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 18,75 pg/mL,

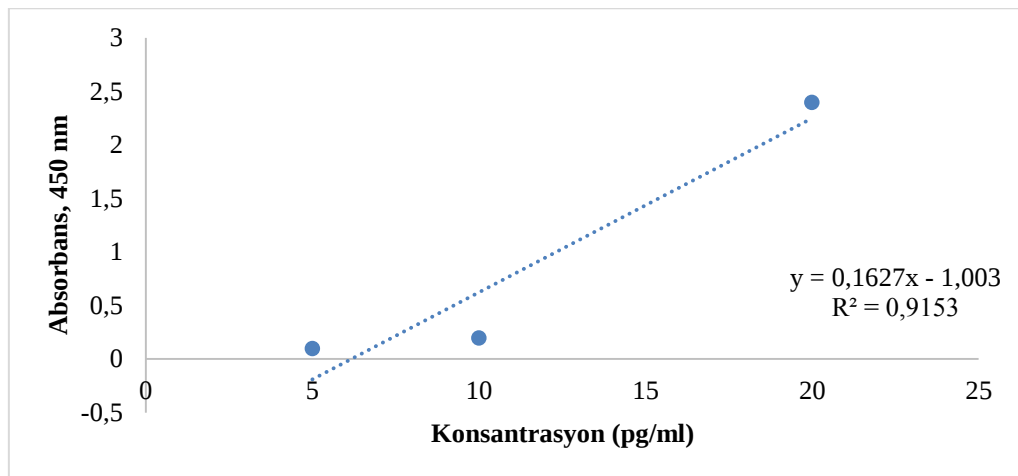
saptama aralığı ise 31,25-2000 pg/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.2.1. Yöntemin Prensibi

İnsan IL-4 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IL-4 spesifik antikoruna ile kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu elde edilir. İnkübasyon ile yıkama işlemi ardından kromojen substrat ilave edilerek, kolorimetrik mavi rengin oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.2) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.2. IL-4 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.3. Plazma IL-12 Düzeyi Tayini

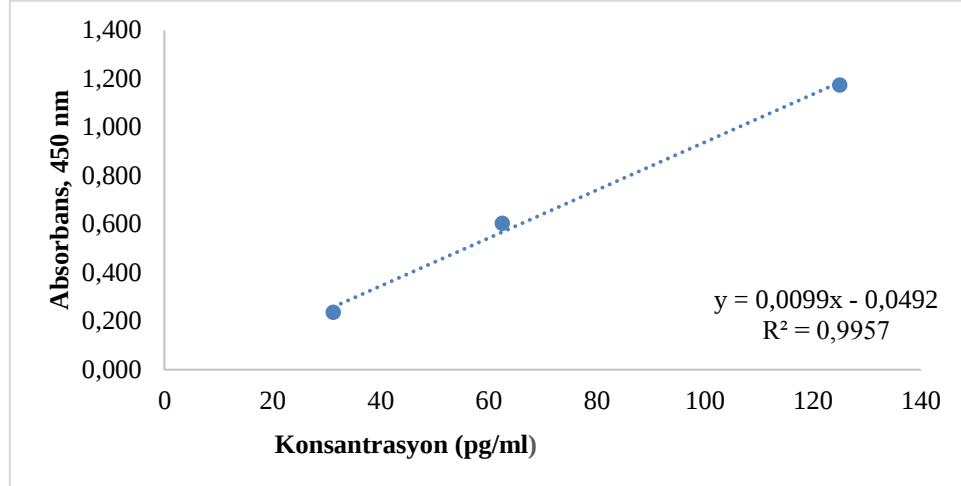
Bu deney, Human IL-12 ELİSA Kit (Fine Test) kullanılarak yapılmıştır. Plazma İnterlökin-12 (IL-12)için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 9,375 pg/mL, saptama aralığı ise 15,625-1000 pg/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.3.1. Yöntemin Prensibi

İnsan IL-12 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IL-12 spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara plazma örneği eklenir. Ardından immün kompleks oluşturmak amacıyla biotin ile işaretlenen antikorlar eklenir, inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanmaktadır. İnkübasyon ve yıkamanın ardından kromojen substrat ilave edilerek, kolorimetrik mavi rengin oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilavesiyle reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucu renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.3) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.3. IL-12 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.4. Plazma IFN- α Düzeyi Tayini

Bu deney, Human IFN- α Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma interferon-alfa (IFN- α) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 9,375 pg/mL, saptama aralığı ise 15,625-1000 pg/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

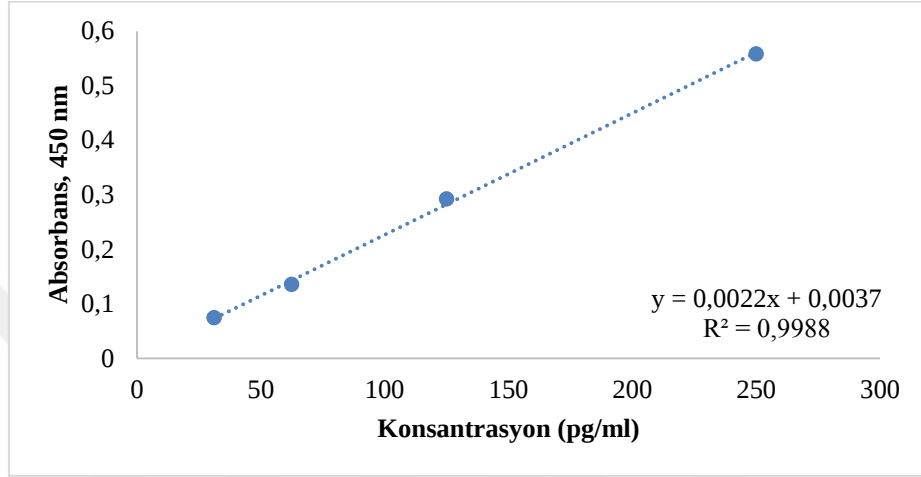
Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.4.1. Yöntemin Prensibi

İnsan IFN- α seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IFN- α spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenen antikorlar eklenir inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından kromojen substrat ilave edilerek, kolorimetrik mavi rengin oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonunun

ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.4) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.4. IFN-α ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.5. Plazma IFN-γ Düzeyi Tayini

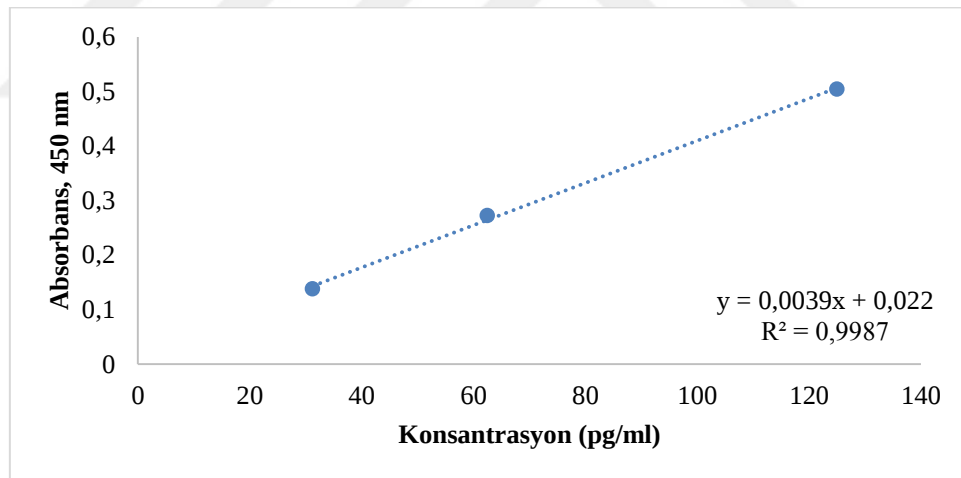
Bu deney, Human IFN-γ Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma interferon-alfa (IFN-α) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 9,375 pg/mL, saptama aralığı ise 15,625-1000 pg/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerinin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.5.1. Yöntemin Prensibi

İnsan IFN- γ seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi IFN- γ spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından kromojen substrat eklenir ve kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonunun ilavesiyle reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.5) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.5. IFN- γ ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.6. Plazma TSP-1 Düzeyi Tayini

Bu deney Human TSP-1 Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma trombospondin-1 (TSP-1) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 0,938

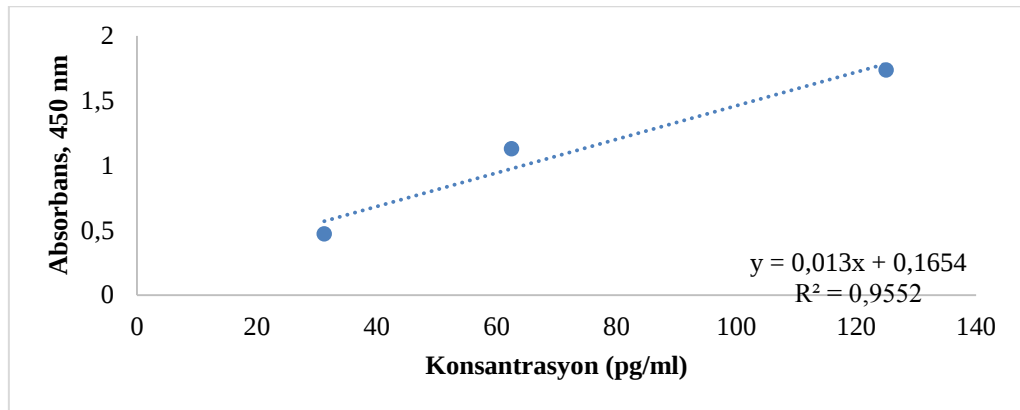
ng/mL, saptama aralığı da 1,563-100 ng/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.6.1. Yöntemin Prensibi

İnsan TSP-1 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi TSP-1 spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından kromojen substrat eklenir, kolorimetrik mavi rengin oluşması sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilavesiyle reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.6) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.6. TSP-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.7. Plazma PAI-1 Düzeyi Tayini

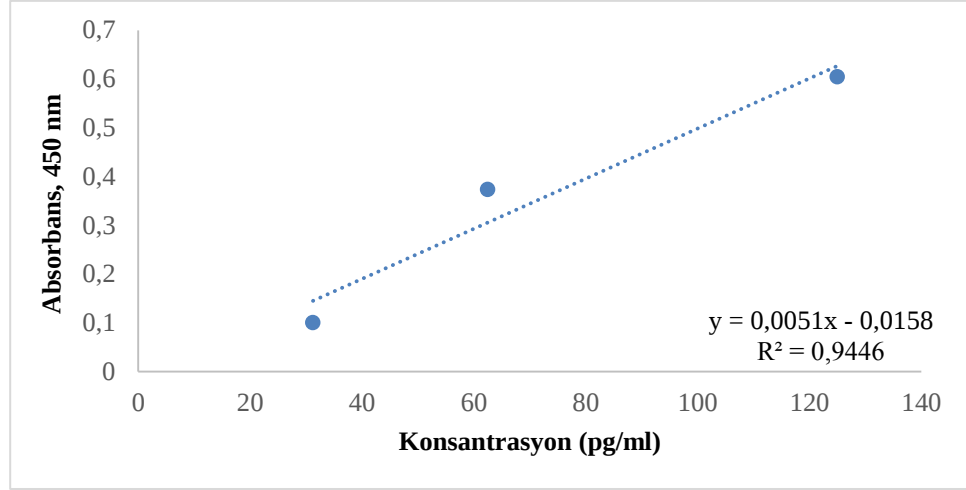
Bu deney, Human PAI-1 Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma trombospondin-1 (TSP-1) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 0,938 ng/mL, saptama aralığı ise 1,563-100 ng/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.7.1. Yöntemin Prensibi

İnsan PAI-1 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi PAI-1 spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenen antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonunun ilave edilmesiyle reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.7) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.7. PAI-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.8. Plazma ANG-1 Düzeyi Tayini

Bu deney, ANG-1 Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma angiopoetin-1 (ANG-1) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 0,094 ng/mL, saptama aralığı da 0,156-10 ng/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

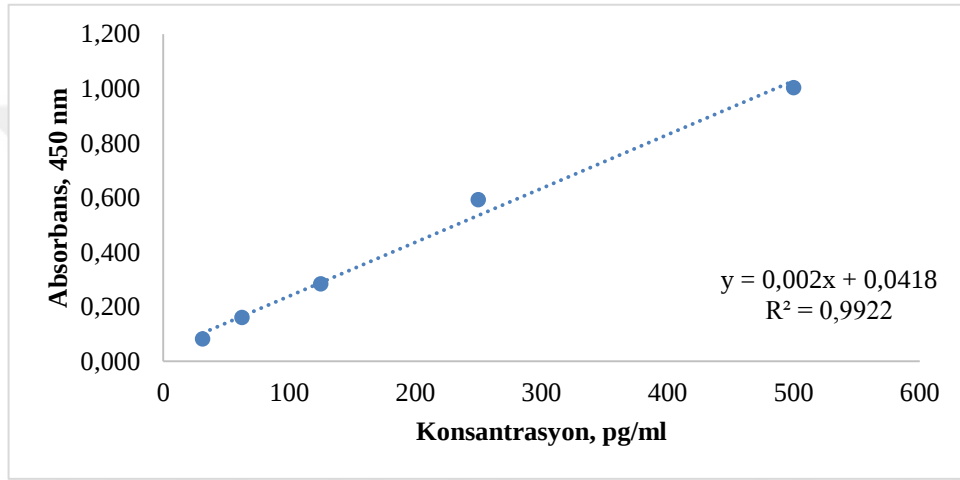
Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.8.1. Yöntemin Prensibi

İnsan ANG-1 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi ANG-1 spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. Inkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat

eklenerek, kolorimetrik mavi renk oluşumu sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.8) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.8. ANG-1 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.9. Plazma ANG-2 Düzeyi Tayini

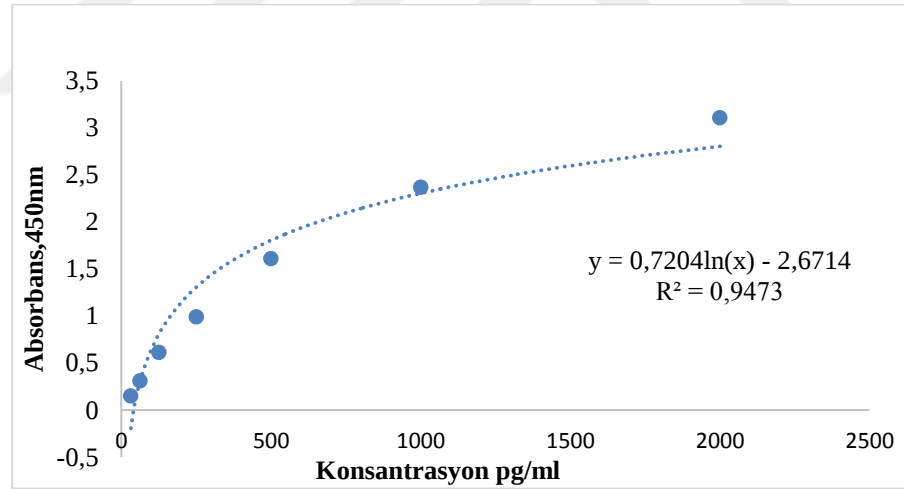
Bu amaçla, ANG-2 Elisa Kit kullanılmıştır. Plazma anjiopoetin-2 (ANG-2) için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 28,125 pg/mL, saptama aralığı ise 46,875-3000 ng/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerinin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.9.1. Yöntemin Prensibi

İnsan ANG-2 seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi ANG-2 spesifik antikorlu ile kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşması sağlanmaktadır. İnkübasyon ve yıkama işleminin ardından kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi rengin oluşması sağlanır. Durdurma (stop) solüsyonu ilavesi ile reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.9) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.9. ANG-2 ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.4.10. Plazma VEGF Düzeyi Tayini

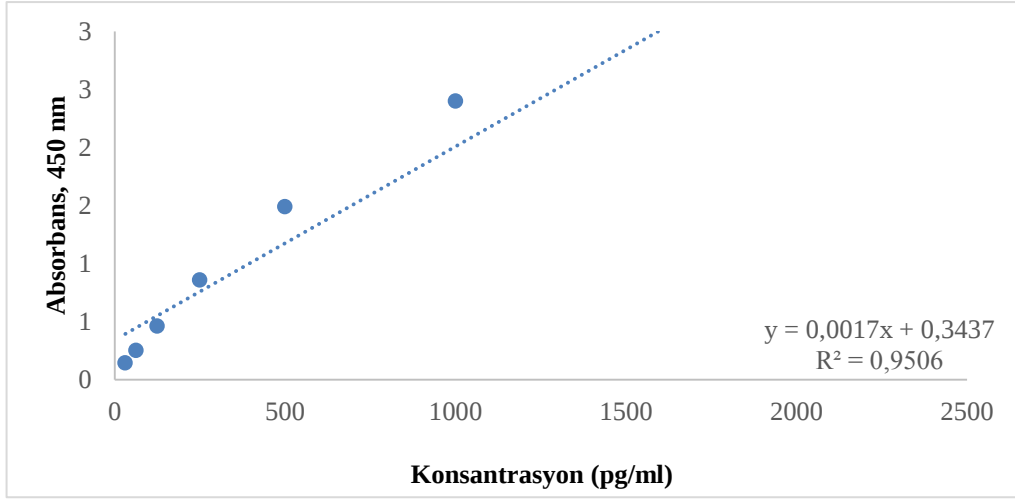
Bu deney, VEGF Elisa Kit kullanılarak yapılmıştır. Plazma VEGF için kullanılan kitin (FineTest) analitik duyarlılığı 18,75 pg/mL, saptama aralığı ise 31,25-2000 pg/mL'dir. Test içi ve testler arası CV'ler sırasıyla %8 ve %10'dan azdır.

Sonuçlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hasta numunelerinin ve kontrollerin plazma numuneleri için elde edilen A450 değerlerine göre ifade edilmiştir.

2.4.10.1. Yöntemin Prensibi

İnsan VEGF seviyelerini analiz etmek için sandviç ELİSA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tekniği kullanılmaktadır. Doksan altı kuyucuktan oluşan plak yüzeyi VEGF spesifik antikoruyla kaplıdır. Kuyucuklara elde edilen plazma numuneleri ilave edilir. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir ve inkübasyon ve yıkama sonrasında HRP-streptavidin (SABC) ilave edilerek kompleks oluşumu sağlanır. Inkübasyon ve yıkama işlemi sonrasında kromojen substrat eklenerek, kolorimetrik mavi rengin oluşması sağlanmaktadır. Durdurma (stop) solüsyonunun ilavesiyle reaksiyon durdurulur. Konsantrasyon sonucunda renk şiddeti farklılık göstermektedir. Kuyucuklardaki renk şiddeti 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okunur ve hesaplamalar yapılır.

Kuyucuklardaki renk şiddeti, 450 nm dalga boyunda mikropalak okuyucu spektrofotometrede okundu ve standart grafiği (Şekil 2.10) çizilerek hesaplandı.



Şekil 2.10. VEGF ELİSA analizi için kalibrasyon eğrisi.

2.5. Gen Ekspresyon Analizleri

Gerçek zamanlı kantitatif PCR (Real time PCR) analizi ilk kez 1993 yılında Higuchi ve ark. tarafından gerçekleştirilmiş ve gelişerek günümüze kadar gelmiştir (Kubista ve ark., 2006). Bu yöntemde, ters transkripsiyon yardımıyla mRNA'dan cDNA elde edilmesinden sonra, değerlendirilmek istenilen gene özgü primerler, DNA polimeraz enzimi ve ilgili deney bileşenleri kullanılıp, genin çoğaltılması sağlanarak gen analizi yapılabilmektedir. (Derisi ve ark.,1998).

2.5.1. Plazmadan RNA İzolasyonu

Bu amaçla QIAamp RNA Blood Mini Kit kullanılmıştır.

2.5.1.1. Yöntemin Prensibi

RNA'nın kandan saflaştırılması için QIAamp prosedürü sırasında, eritrositler seçici olarak parçalanır ve lökositler ilk santrifüjleme sırasında geri kazanılır. Lökositler daha sonra, RNazları inaktive eden ve sağlam RNA'nın izole edilmesine izin veren yüksek denatüre edici koşullar kullanılarak parçalanır. Lizatın bir QIAshredder döndürme kolonu boyunca kısa bir santrifüjleme ile homojenleştirilmesinden sonra, bağlama koşullarını ayarlamak için etanol eklenir ve örnek QIAamp döndürme kolonuna aktarılır. RNA, kısa bir santrifüjleme basamağı sırasında silika zarına bağlanır. Diğer maddeler yıkanarak uzaklaştırılır ve toplam RNA, herhangi bir sonraki uygulamada doğrudan kullanım için 40 µL veya daha fazla RNaz içermeyen su içinde elüte edilir. Homojenleştirilmiş hücre lizatları, birkaç ay boyunca -70°C'de saklanabilir.

İşlem sağlam lökositlere dayandığından, donmuş tam kan kullanılamaz.

2.5.1.2. Yöntemin Uygulanışı

- EDTA'lı tüplere alınmış olan tam kan örneklerinden 500 µL kan alınıp 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı.
- 1 volüm kan üzerine 5 volüm Buffer EL (Erythrocyte Lysis Buffer) eklendi. (500 µL kan için 2,5 mL Buffer EL eklendi).
- Tüpler 15 - 20 dakika buzda bekletildi. 2 dakika aralıklarla vortekslendi.
- Tüpler buzdan alınarak 10 dakika 4000 rpm hızında, 4°C'de santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra supernatant atıldı.
- Oluşan pelletin üzerine 1 mL Buffer EL kondu ve tüpler vortekslendi.
- Tüpler 10 dakika 4000 rpm hızında, 4°C'de santrifüj edildi.
- Oluşan pellet üzerine 350 µL Buffer RLT konuldu. Vortekslendi.
- Oluşan lizatları QiaShredder spin kolonlara aktarıldı.
- 2 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
- QiaShredder kolonlar atıldı. Lizatlar kullanıldı.

- Lizat üzerine 350 µL %70 alkol eklenerek pipetleme yapıldı.
- Lizat Qiaamp spin kolonlara aktarıldı.
- 15 saniye 8000 xg hızda santrifüj edildi. Kolonlar yeni toplayıcı kolonlara aktarıldı.
- 700 µL Buffer RW1 eklendi.
- 15 saniye 8000 xg hızda santrifüj edildi. Tüpler yeni toplayıcı kolonlara aktarıldı.
- 500 µL Buffer RPE eklendi.
- 15 sn. 8000 xg santrifüj edilir. Tüpler yeni toplayıcı kolonlara aktarıldı.
- 500 µL Buffer RPE eklendi.
- 3 dakika 14.000 xg maksimum hızda santrifüj edildi.
- Qia amp kolonlar 1,5 mL'lik eppendorf tülere alınır ve 40 µL RNase içermeyen su eklendi.
- 1 dakika 8000 xg santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atıldı. Eppendorf tüpte bulunan RNA -80°C'de saklandı.

2.5.1.3. RNA Miktar Tayini

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü. İzole edilmiş RNA örnekleri, 260 ile 280 nm dalga boylarında absorbansları ölçülerek konsantrasyon ve saflıkları ölçüldü.

İzole edilen RNA örneklerinin saflık derecesi 260 nm ve 280 nm'deki absorbans oranlarından tespit edilir, ideal saflıkta olan RNA'nın, A260/ A280 absorbans oranı 1,8-2,0 olarak bulunması gereklidir.

Reaksiyon başına 2 µg RNA kullanılmıştır. Hasta ve kontrol grubuna ait izole edilen RNA örneklerinden belirtilen miktarda alınıp, spektrofotometrede ölçülmek üzere özel plaklara uygulanmış ardından absorbans okunarak miktar tayini okuması gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon analizleri için 100 ng RNA kullanılmıştır.

2.5.2. cDNA Sentezi

mRNA moleküllerinden ters transkriptaz enzimi aracılığı ile komplementer çift iplikli DNA (cDNA) sentezi yapılarak, gen ekspresyonu analizlerinin gerçekleştirilmesini sağlayan hassas bir yöntemdir.

RT² birinci iplikçik kiti, birinci iplikçik cDNA sentezi için verimli, hızlı ve kolay bir prosedür sağlamaktadır.

2.5.2.1. Reaktiflerin Hazırlanması

Genomik DNA Eliminasyon Karışımı

Bileşenler ve miktarlar

GE Tamponu: 2 µL

RNA: 25 ng-5 µg

Nükleaz içermeyen su: Değişken

Toplam Hacmi: 10 µL

Genomik DNA eliminasyon karışımı 42°C'de 5 dakika inkübe edilir, sonrasında en az 1 dakika boyunca buzun üzerine bekletilir.

Ters Transkripsiyon Karışımı

Bileşenler ve 1 (bir) reaksiyonluk hacim

Kontrol P: 1 µL

5x BC3 Tmponu: 4 µL

RE3 Ters Transkripsiyon Karışımı: 2 µL

Nükleaz içermeyen su: 3 µL

Toplam hacmi: 10 µL

2.5.2.2. Yöntemin Uygulanışı

- İzole ettiğimiz RNA'ları hepsi eşit olacak şekilde Nükleaz içermeyen su ile 10 µL'ye tamamlandı.
- Dilüe edilmiş çözeltiden 8 µL eppendorf tüplerine alındı.
- Üzerine 10 µL DNA eliminasyon karışımı eklendi.
- Genomik DNA'dan kurtulmak için 42°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler soğuk bloğun üzerine alındı ve her birinin üzerine 8 µL ters transkripsiyon karışımı eklendi.
- 20 dakika cDNA cihazında sentez edildi.
- Son olarak her bir tüpe 91 µL RNase içermeyen su eklendi ve tüpler -20°C kaldırıldı.

2.5.3. Real-Time PCR Analizi

Qiagen RotorGene sistemi kullanılarak nicel gerçek zamanlı PCR yapıldı. GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz), normalizasyon için bir referans (housekeeping) geni olarak kullanıldı.

İleri ve geri primer dizilimi: ENG için 5'-TGCATTGGCCTACAATTCCA-3' ileri, 5'-AGCTGCCCCACTCAAGGATCT-3' ters; VEGFA için 5'-

AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3' ileri, 5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3' geri; VEGFR1 için 5'-GAAAACGCATAATCTGGGACAGT-3' ileri, 5'-GCGTGGTGTGCTTATTTGGA-3' geri; prostaglandin E2 (PGE-2) için 5'-ATGCTGACTATGGCTACAAAAGC-3' ileri, 5'-TCGGGCAATCATCAGGCAC-3' geri; HIF-1 α için 5'-ATCCATGTGACCATGAGGAATG-3' ileri, 5'-TCGGCTAGTTAGGGTACACTTC-3' geri.

2.6. Platelet İzolasyonu ve Anneksin V Bağlanma Analizi

Hücreler apoptoza gittiklerinde normal şartlarda stoplazmik yüzeyde yer alan fosfatidilserin (PS) moleküllerinin hücrenin dış yüzüne transloke oldukları bilinmektedir.. Anneksin V ise, fosfatidilserine affinitesi yüksek olan bir protein olduğu için, bağlanma oranları floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek akım sitometrisi yardımı ile ölçülebilmektedir. (Gatti ve ark.,1998), (Koopman ve ark.,1994).

Bu prensipten yola çıkarak, EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilerek trombositler ayrıştırıldı. Kan örnekleri 20 dakika boyunca 200 xg'de santrifüjleme yapıldı. Trombositten zengin plazma, trombositleri çöktürmek için 20 dakika boyunca 1000 xg'de santrifüjlendi. İzole edilen trombositler Ca^{+2}/Mg^{+2} bulundurmeyen PBS tampon çözeltisi ile üç kez yıkanarak, $2,5 \times 10^6$ hücre/mL konsantrasyonuna getirildi. Trombositlere bağlanan annexin V (AnxV), üreticinin talimatlarına göre AnxV-bağlanma kiti (Luminex, Almanya) kullanılarak değerlendirildi.

Kısaca, 100 μ L hücre süspansiyonuna 100 μ L AnxV reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Fosfatidilserin maruziyetine dayalı ANX5 pozitif hücre popülasyonu, Muse Cell Analyzer (Millipore) ile belirlendi.

2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6.0e (Macintosh Version by Software MacKiev, GraphPad Software, Inc) programı kullanılarak gerçekleştirildi. ELISA sonuçları, ortalama $\pm$ standart sapma (SD) kullanılarak gösterildi ve karşılaştırmalar Mann-Whitney U testinden yararlanılarak yapıldı. Kategorik parametreler χ^2 testi ile hesaplandı. Gerçek zamanlı PCR analizleri ve ANX5 bağlanma analiz bulguları, One-Way ANOVA testi ile hesaplandı. Korelasyon analizlerinde Pearson korelasyon testinden yararlanıldı ve istatistiksel anlamlılık $P < 0,05$ değerinin sağlanmasına göre değerlendirildi.



3. BULGULAR

Bu çalışmada, orta veya şiddetli hemofili (hemofili A, n=22; hemofili B, n=6) olan 28 çocuk ve benzer yaş ve cinsiyetteki 29 sağlıklı kontrol grubunun ENG proteini ve çeşitli adipositokinlerin plazma seviyeleri ölçüldü. Çizelge 3.1’de hastaların ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Hastaların ve kontrol grubunun demografik ve klinik özellikleri.

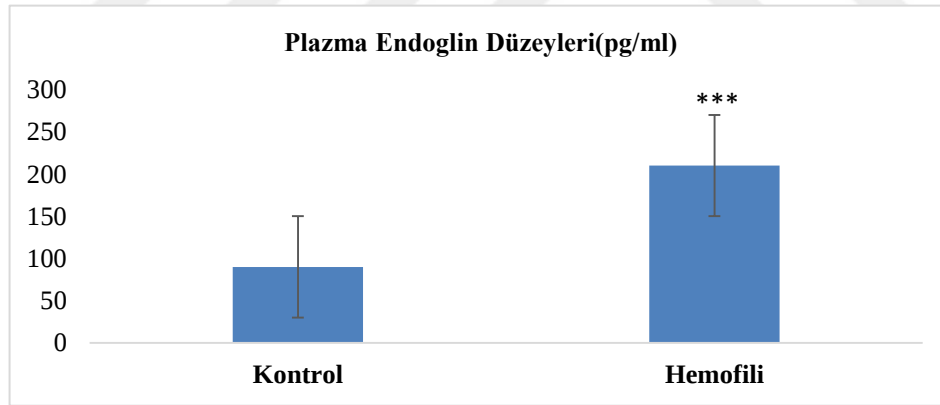
Değişkenler	Hemofili (n=28)	Kontrol (n=29)
Yaş (yıl), ortalama $\pm$ SD *	8,55 $\pm$ 5,81	9,35 $\pm$ 3,05
Erkek, n (%) *	28 (100)	29 (100)
Hemofili tipi, n (%)		
Hemofili A (n=22)		
Ağır (faktör VIII $\leq$ 1%)	19 (86,4)	ND
Orta (faktör VIII >1 to $\leq$ 5%)	3 (13,6)	ND
Hemofili B (n=6)		
Ağır (faktör IX $\leq$ 1%)	5 (16,6)	ND
Orta (faktör IX >1 to $\leq$ 5%)	1 (10)	ND
Profilaksi, n (%)	25 (89,2)	ND
Kanadıkça tedavi, n (%)	3 (10,8)	ND
Son 12 aydaki eklem kanamaları oranı, medyan $\pm$ SD (min-maks)		
Ağır hemofili A&B	0,9 $\pm$ 0,9 (0-3)	ND
Orta hemofili A&B	1 $\pm$ 1,7 (0-3)	ND
Hedef eklemi olan hastalar, n (%)	5 (17,8)	ND
Faktör seviyesi, %		
$\leq$ 1	85,7	ND
>1	14,3	ND

*Hemofili grubu ile kontrol grubunun arasında demografik özellikler bakımından anlamlı bir farklılık yoktur. Kısaltmalar: ND, Karar verilmedi; NS, Önemsiz.

Çizelge 3.2. Anjiogenez ilişkili sitokinler ve biyobelirteçlerin hemofili hastaları ve kontrol grubuna ait plazma düzeyleri.

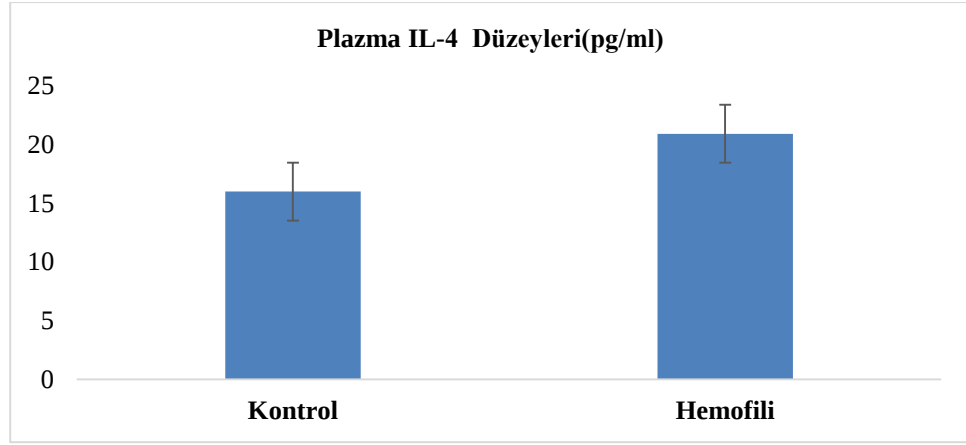
	Kontrol grubu (n=29)	Hemofili grubu (n=28)	P değeri
ENG (pg/mL)	90,00±20,00	210,00±130,00	<0,0001
IL-4 (pg/mL)	16,00±2,68	20,93±9,86	NS
IL-12 (pg/mL)	413,03±243,02	97,78±25,58	<0,0001
IFN- α (pg/mL)	82,12±29,93	1564,77±1111,33	<0,0001
IFN- γ (pg/mL)	43,94±36,65	76,38±21,11	<0,0001
TSP-1(pg/mL)	233,01±71,75	295,08±34,22	0,0002
PAI-1(pg/mL)	106,67±39,40	691,13±462,21	<0,0001
ANG-1 (pg/mL)	2151,15±1023,73	1960,91±1267,26	NS
ANG-2 (pg/mL)	4293,41±151,47	4309,68±100,90	0,005
VEGF (pg/mL)	154,71±74,29	1070,26±391,00	<0,0001

Sonuçlar ortalaması±SD olarak ifade edilmiştir, P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ENG, endoglin; IL, interlökin; INF, interferon; TSP, plazma trombospodin; PAI, plazminojen aktivatör inhibitörü; ANG, anjiopoetin; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü; NS, istatistiksel olarak anlamsız

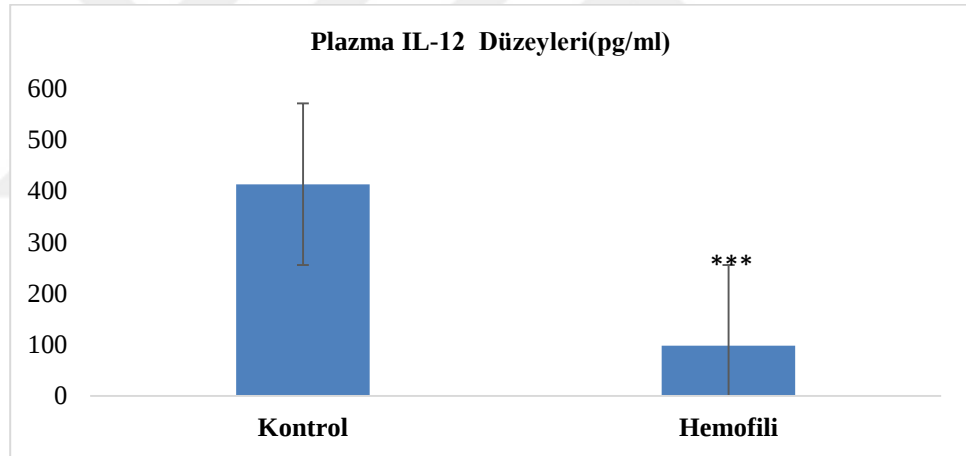


Şekil 3.1. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında endoglin düzeyleri (pg/ml)
*** P<0,0001

Plazmadaki biyobelirteç ve sitokin düzeylerinin analizi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hemofili grubunda ENG düzeyleri anlamlı ölçüde yüksek bulundu (210 ± 130 pg/mL'ye karşılık 90 ± 20 ng/mL, P<0,0001) (Şekil 3.1).



Şekil 3.2. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IL-4 düzeyleri (pg/ml)

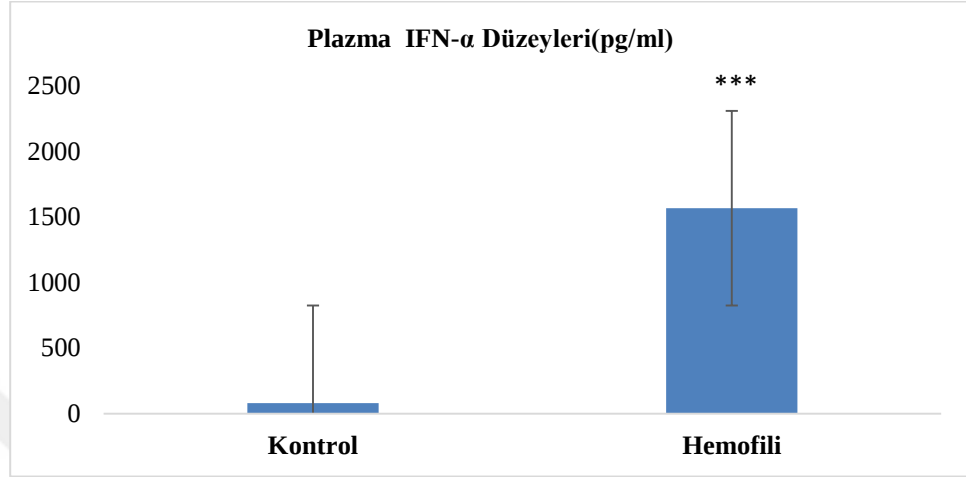


Şekil 3.3. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IL-12 düzeyleri (pg/ml)

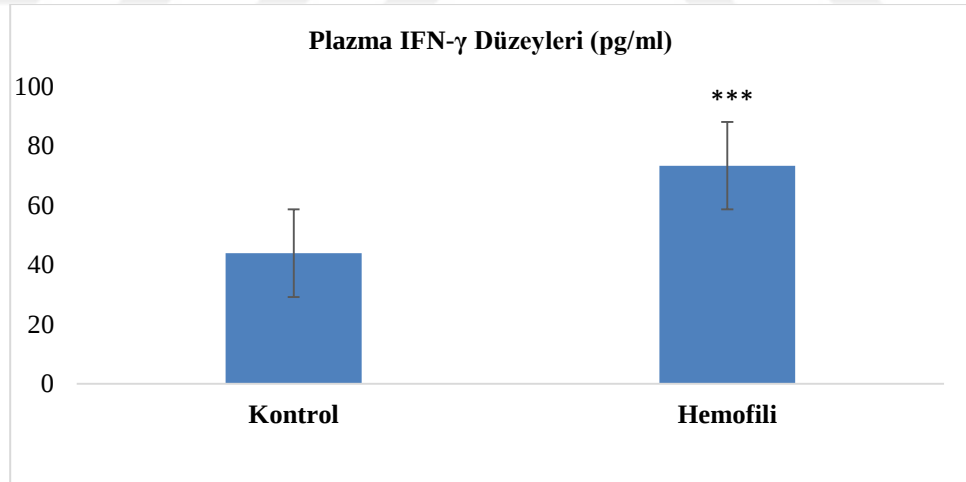
***P<0,0001

Plazma IL-4, IL-12, IFN- α ve IFN- γ seviyeleri de çalışma kapsamında değerlendirildi. Hemofili ile kontrol gruplarının IL-4 seviyeleri bakımından anlamlı bir farklılık göstermediği bulundu (Şekil 3.2).

Öte yandan, hemofili hastalarında IL-12 düzeyleri anlamlı olarak daha düşük (sırasıyla $97,78 \pm 25,58$ pg/mL ve $413,03 \pm 243,02$ pg/mL, $P < 0,0001$) olarak bulundu (Şekil 3.3).



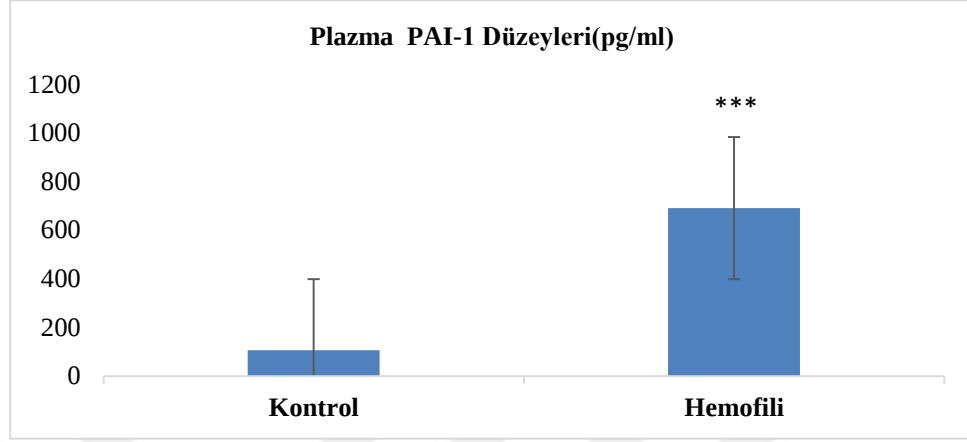
Şekil 3.4. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IFN-α düzeyleri (pg/ml)
*** $P < 0,0001$



Şekil 3.5. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında IFN-γ düzeyleri (pg/ml)
*** $P < 0,001$

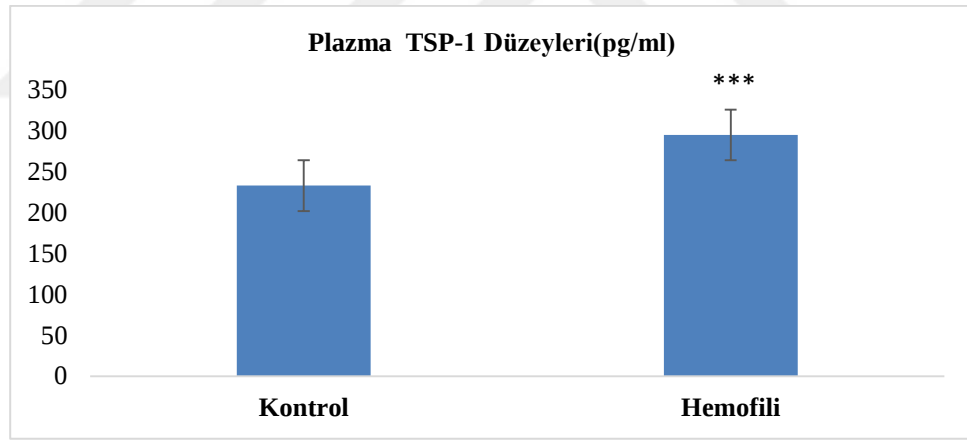
IFN-α ve IFN-γ düzeyleri ise de hemofili grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu (IFN-α hemofili grubu $1564,77 \pm 1111,33$ pg/mL, kontrol grubu $82,12 \pm 29,93$

pg/mL, $P<0,0001$; IFN- γ hemofili grubu $76,38\pm21,11$ pg/mL, kontrol grubu $43,94\pm36,65$ pg/mL, $P<0,001$) (Şekil 3.4) (Şekil 3.5).



Şekil 3.6. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında PAI-1 düzeyleri (pg/ml)

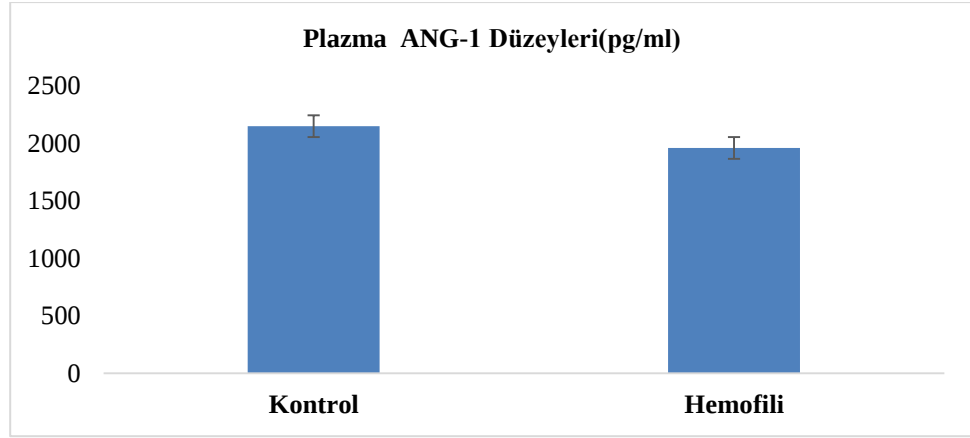
*** $P<0,0001$



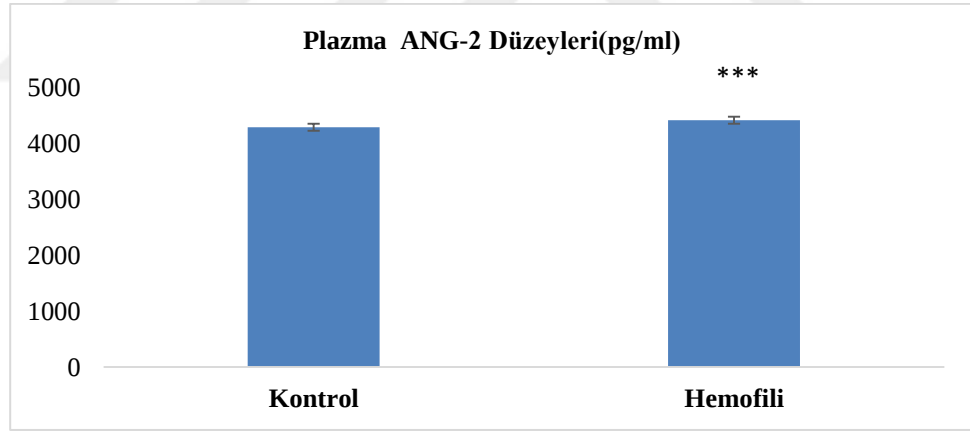
Şekil 3.7. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında TSP-1 düzeyleri (pg/ml)

*** $P<0,0002$

Benzer şekilde, plazma PAI-1 ($691,13\pm462,21$ pg/mL'ye karşılık $106,67\pm39,40$ pg/mL, $P<0,0001$) (Şekil 3.6) ve TSP-1 ($295,08\pm34,22$ pg/mL'ye karşı $233,01\pm71,75$ pg/mL, $P=0,0002$) (Şekil 3.7) seviyeleri, kontrol grupları ile kıyaslandığında hemofili hastalarında anlamlı olarak yüksek olduğu gösterildi.



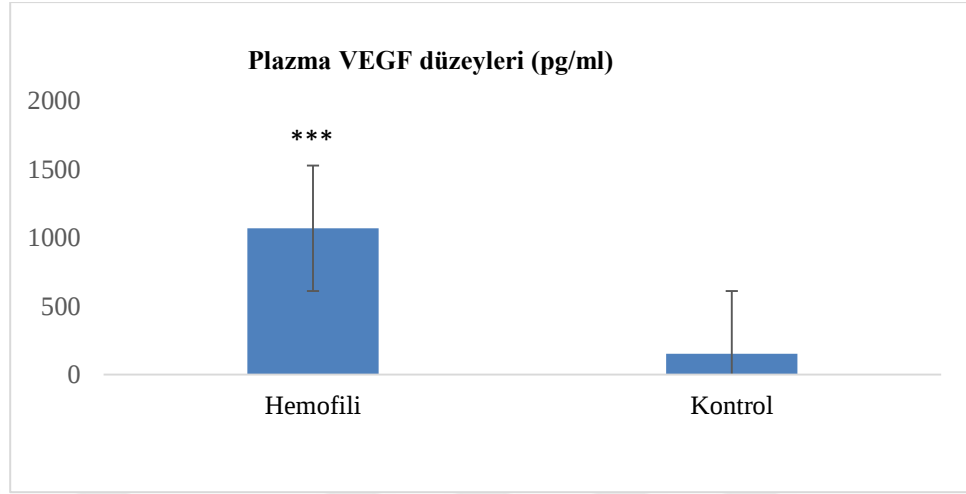
Şekil 3.8. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında ANG-1 düzeyleri (pg/ml)



Şekil 3.9. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında ANG-2 düzeyleri (pg/ml)

*** P=0,005

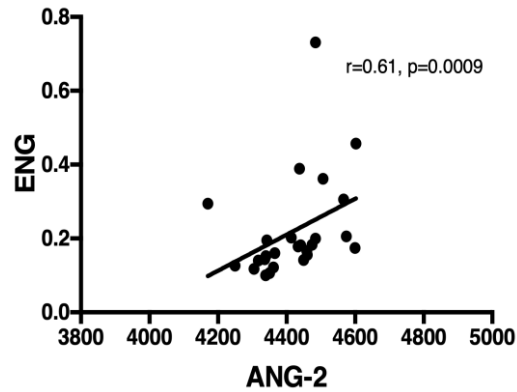
Hasta ve kontrol gruplarında, Plazma ANG-1 düzeyleri bakımından anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 3.8); ancak plazma ANG-2 seviyeleri hemofili grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu ($4417,73 \pm 100,90$ pg/mL'ye karşılık $4309,68 \pm 151,47$ pg/mL, $P=0,005$) (Şekil 3.9).



Şekil 3.10. Kontrol grubu ve hemofili hastalarında VEGF düzeyleri (pg/ml)
*** P=0,0001

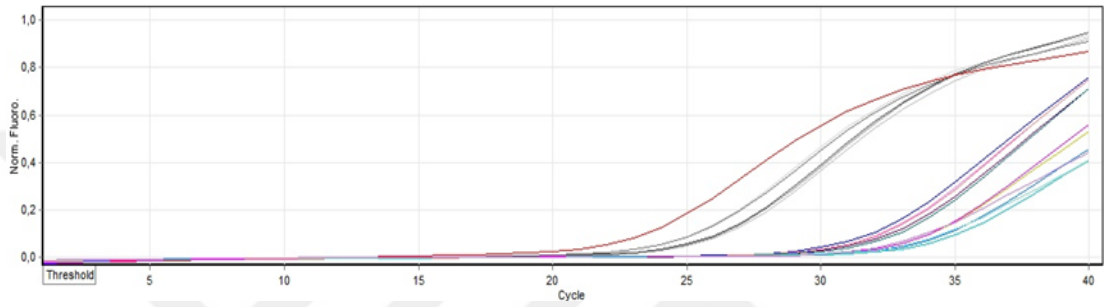
Ayrıca, plazma VEGF düzeyleri hemofili grubunda kontrole kıyasla (1070,26±391,00 pg/mL, 154,71±74,29 pg/mL, P<0,0001) anlamlı oranda daha yüksek bulundu (Şekil 3.10).

Plazma düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunan sitokinler arasında yapılan korelasyon analizi bulgularına göre, ENG ve ANG-2 arasında anlamlı bir pozitif korelasyon saptandı (Şekil 3.11).

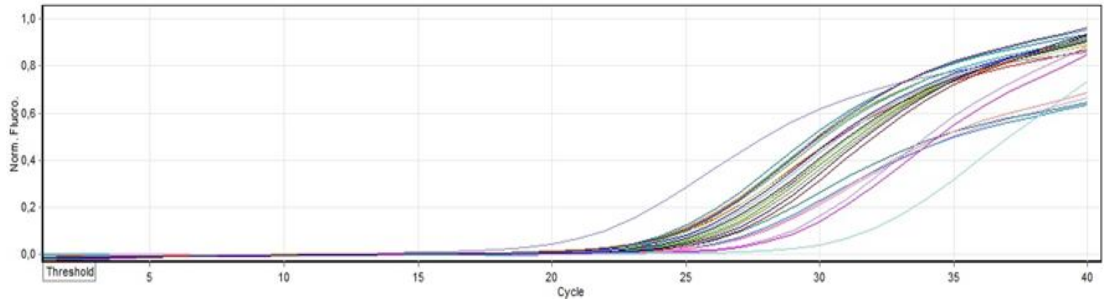


Şekil 3.11. Hemofili hastalarında ENG ve ANG-2 sitokinleri arasındaki korelasyon ilişkisi. Korelasyon analizi olarak Spearman analizi kullanıldı ve istatistiksel analizde $P < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

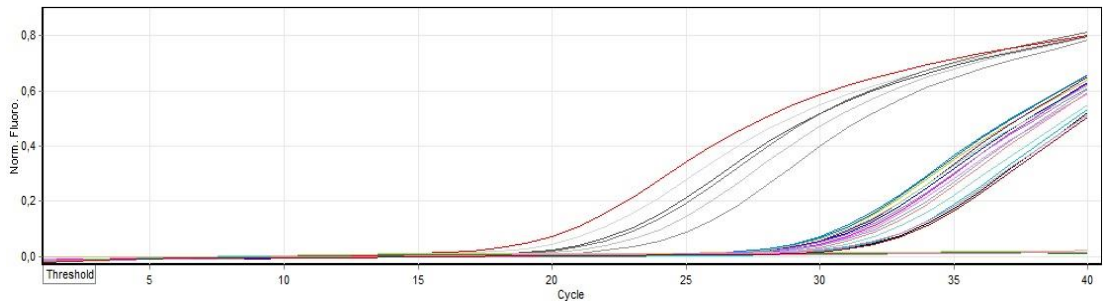
Bu tez çalışmasında ayrıca, hastalarda ENG, HIF-1 α , PGE-2, VEGFA ve VEGFR1 genlerinin mRNA ekspresyonu analiz edildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Hemofili ve kontrol grubu PCR analizlerine ait amplifikasyon eğrileri Şekil 3.12. – Şekil 3.23. de sunulmuştur.



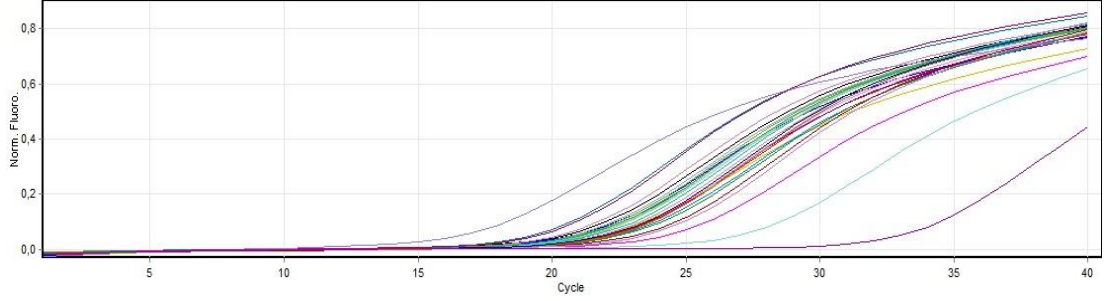
Şekil 3.12. Kontrol grubuna ait endoglin amplifikasyon eğrisi.



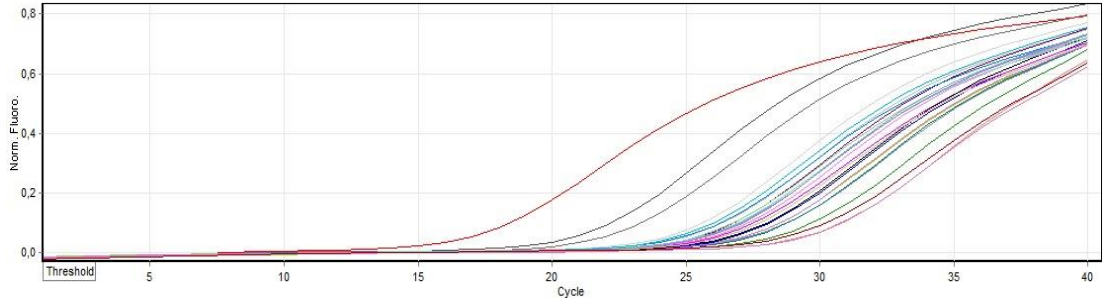
Şekil 3.13. Hemofili grubuna ait endoglin amplifikasyon eğrisi.



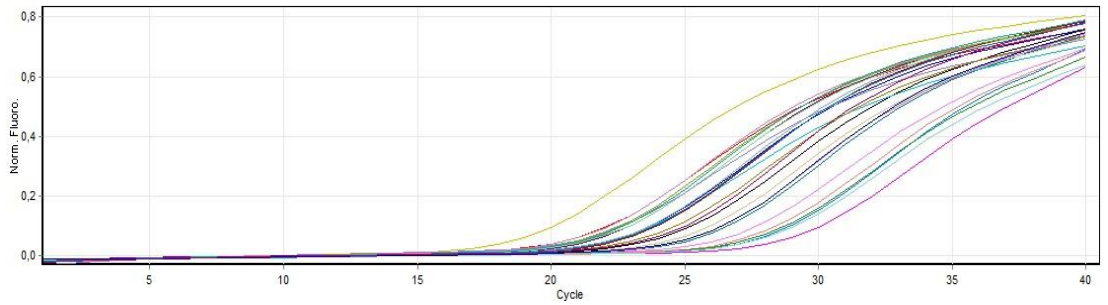
Şekil 3.14. Kontrol grubuna ait HIF-1 α amplifikasyon eğrisi.



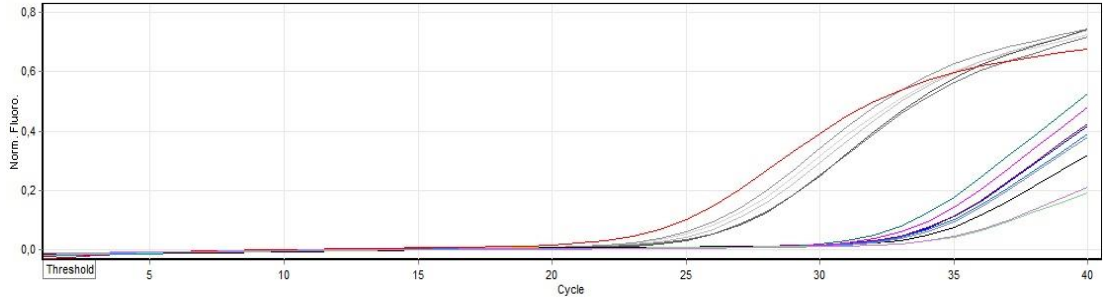
Şekil 3.15 Hemofili grubuna ait HIF-1 α amplifikasyon eğrisi.



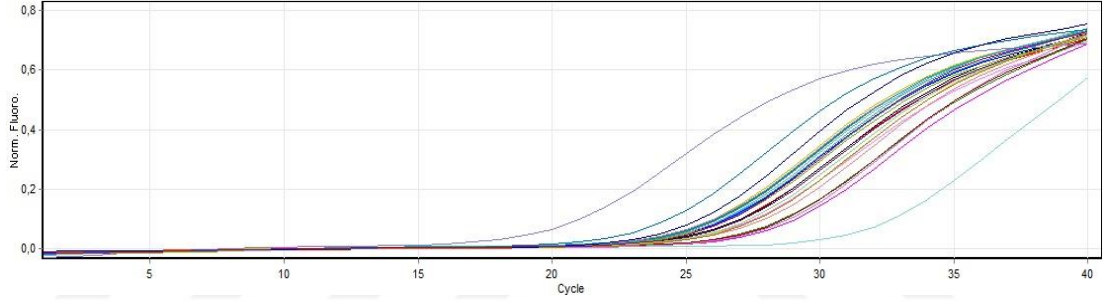
Şekil 3.16. Kontrol grubuna ait PGE2 amplifikasyon eğrisi.



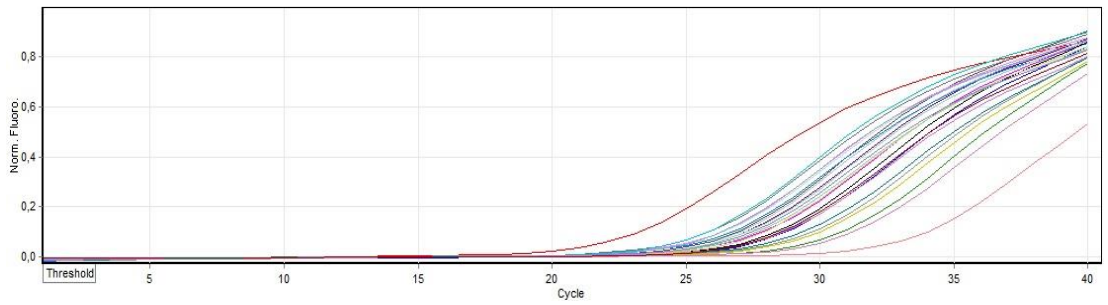
Şekil 3.17. Hemofili grubuna ait PGE2 amplifikasyon eğrisi.



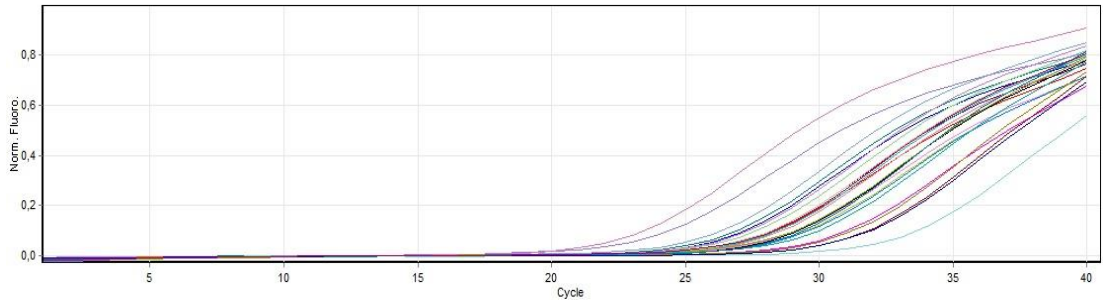
Şekil 3.18. Kontrol grubuna ait VEGFA amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.19. Hemofili grubuna ait VEGFA amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.20. Kontrol grubuna ait VEGFR1 amplifikasyon eğrisi.



Şekil 3.21. Hemofili grubuna ait VEGFR1 amplifikasyon eğrisi.

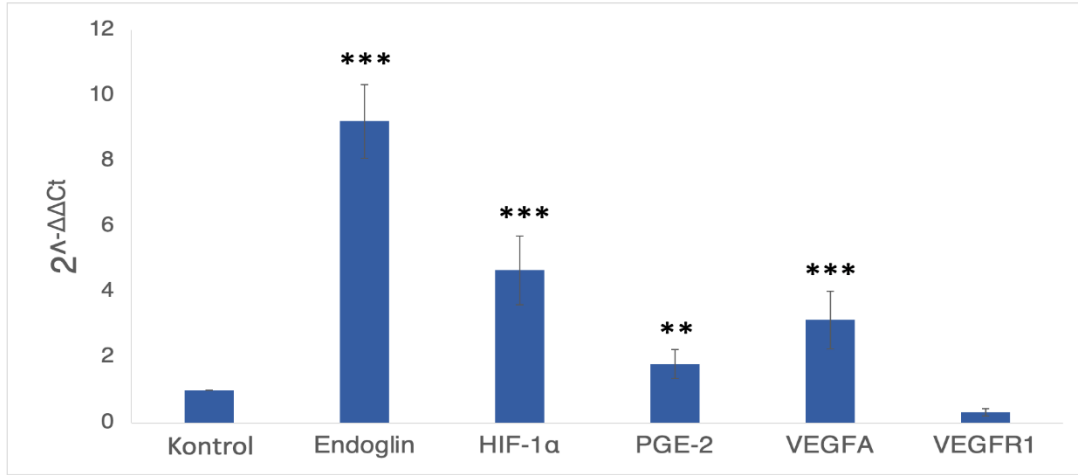
Hemofili grubunda ENG, HIF-1 α , PGE-2 ve VEGFA mRNA ekspresyon düzeylerindeki artış (fold increase) sırasıyla; $9,22 \pm 1,13$ ($P < 0,0001$), $4,66 \pm 1,05$ ($P < 0,0001$), $1,81 \pm 0,45$ ($P < 0,01$) ve $3,15 \pm 0,88$ ($P < 0,0001$) olarak hesaplandı. (Çizelge 3.3).

Her iki grup için yapılan VEGFR1 mRNA düzeylerinin istatistiksel analizinde ise anlamlı bir değişiklik bulunamadı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Anjiyogenez ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri.

	Hemofili grup (n=28)	P değeri
ENG	$9,22 \pm 1,13$	$<,0001^*$
HIF-1 α	$4,66 \pm 1,05$	$<,0001^*$
PGE-2	$1,81 \pm 0,45$	$<,01^*$
VEGFA	$3,15 \pm 0,88$	$<,0001^*$
VEGFR1	$0,31 \pm 0,11$	NS

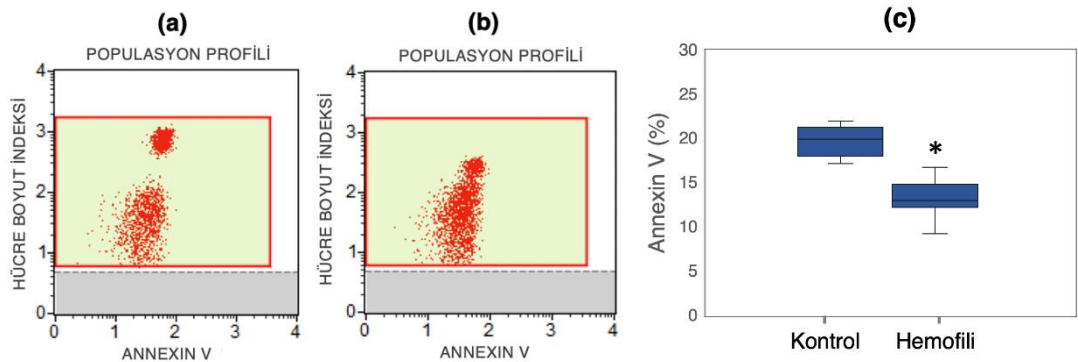
Sonuçlar kontrole göre artış (fold increase) olarak ortalama $\pm$ SD olarak belirtildi. İstatistiksel analizde $P < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi. ENG, endoglin; HIF-1 α , hipoksi ile indüklenebilir 1-alfa; PGE-2, prostaglandin-2; VEGFA, vasküler endotelial büyüme faktörü A; VEGFR1, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü 1; NS, önemsiz.



Şekil 3.22. Kontrol ve hemofili grubunda çeşitli genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri. Sonuçlar 2^{-ΔΔCt} yöntemine göre hesaplanmıştır. Kontrole kıyasla; **P<0,01; ***P<0,0001.

Bu çalışmada ayrıca, akım sitometri prensibi ile analiz yapan hücre analizörü ile hemofili grubu ve kontrol grubunun platelet örneklerinde AnxV bağlanması incelendi.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda AnxV bağlanan hücre popülasyonu %19,73±1,69 iken, hemofili grubunda %12,75±1,98 şeklinde anlamlı ölçüde azaldığı saptandı (P<0,05). Floresan histogramında, hemofili grubunda ANX5 bağlanmasında yaklaşık 1,5 kat azalma olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.23).



Şekil 3.23. Trombositlere annexin V (ANX5) bağlanma analizi bulguları.

Trombosit popülasyonu seçildi ve kontrol (a) ve hemofili (b) gruplarında floresan izotiyosiyanat işaretli ANX5'in bağlanması analiz edildi. (c) Kontrol ve hemofili gruplarının ANX5 protein bağlanma düzeylerini gösteren kutu grafikler. Kutunun içindeki yatay çizgi, medyan değeri temsil eder. Kutunun dışındaki üst ve alt çizgiler sırasıyla en yüksek ve en düşük değeri temsil eder. *P<0,05.

4. TARTIŞMA

Hemofili, tekrarlayan kanama ataklarıyla seyreden, hastanın kas-iskelet sistemini etkileyen ve dejeneratif eklem artropatisine yol açabilen kalıtsal bir kanama bozukluğudur. Kanamanın nedeni travmatik ya da spontan olabilir. Demir, inflamatuvar sitokinler ve anjiyojenik faktörler gibi birçok faktör bu sürece katkıda bulunduğundan hemofilik artropatinin patogenezinin aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır (Agapidou ve ark., 2016).

Hayvan modelleri ve hücre kültürleri üzerinde yapılan çalışmalar, ENG'nin vasküler gelişim ve tümör anjiyogenezindeki rolünü ortaya koymaktadır (Barnett ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında, hemofilik artropatinin patogenezinde yüksek dereceli neo-anjiyogenez ve anormal vasküler yeniden şekillenmenin rolü olduğu düşünüldüğünden, hemofili hastalarında yeni adipositokinlerden olan ve anjiyogenezde rol oynadığı bilinen ENG'nin mRNA ekspresyonu ve plazma düzeylerinin araştırılması planlanmıştır. Gönüllülerden kan örneklerinin alınması sırasında aktif kanama olmamasına rağmen, hemofili hastalarında hem ENG mRNA ekspresyonu, hem de ENG plazma düzeyi kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur. ENG ile ilgili elde edilen bulgular, söz konusu proteinin kronik inflamatuvar süreci ve sürekli bir neo-anjiyogenez ve eklem hasarı durumunu indükleyebileceğini düşündürmektedir.

Anjiyogenezin esas olarak kemik iliği ve vasküler kök hücrelerde meydana geldiği bilinmektedir. Çalışmalar, VEGF, ANG-1, ANG-2 ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyogenetik faktörlerin endotel hücre proliferasyonuna katıldığını göstermiştir (Agapidou ve ark., 2016). VEGF, VEGFR, ANG-1 ve Fms benzeri tirozin kinaz-1 serum konsantrasyonları, hemofili hastalarında inflamatuvar belirteçler ve kemik rezorpsiyonu ile ilişkilendirilmektedir (Valentino, 2010).

ANG-1 yerleşik neovaskülarizasyonu etkilemezken, ANG-2 endotelial hücreler tarafından üretilmekte ve vasküler yeniden şekillenme bölgelerinde belirgin bir şekilde eksprese edilmektedir (Kim ve ark., 2016). Çalışmalar, ANG-2'nin, esas olarak VEGF ile kombinasyon halinde bir anjiyogenez promotörü olarak işlev gördüğünü ve VEGF seviyeleri düşük olduğunda vasküler regresyonu indüklediğini göstermektedir (Kienast ve ark., 2013).

Yapılan araştırmalar, ANG-1'in büyük ölçüde neovaskülarizasyonun gelişimini inhibe etmek için hareket ettiğini, ANG-2'nin ise vasküler endoteliumu kararsız hale getirmek için hareket ederek VEGF gibi faktörlere daha duyarlı hale getirdiğini göstermektedir (Yoshiji ve ark., 2005).

Serum VEGF ve ANG-1 konsantrasyonları ayrıca erken artrit inflamasyon parametreleri ve kemik rezorpsiyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, anjiyogenezin, hastalığın şiddetini yansıttığı ve anjiyogenez biyobelirteçlerinin, hastalık aktivitesini değerlendirmek ve inflamatuvar artritli hastalar için sonucu tahmin etmek amacı ile yeni ve yararlı bir araç olabileceği belirtilmiştir (Clavel ve ark., 2007). ANG-1 ve ANG-2'nin endotel hücre yüzeyinde pıhtılaşmanın düzenleyicisi olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Daly, 2017). Bu tez çalışmasında ENG ve ANG-2 düzeyleri arasında gözlenen pozitif korelasyon, hemofili hastalarında ENG ve ANG-2'nin inflamasyon ve pıhtılaşma kaskadı üzerindeki etkilerinin birbiri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anjiyogenezin, ağırlıklı olarak makrofajlar ve trombositler tarafından üretilen çeşitli sitokinler aracılığı ile uyarıldığı ve manipüle edildiği bilinmektedir (Repsold ve ark., 2017; Wojtukiewicz ve ark., 2017). Örneğin, makrofajlar tarafından üretilen TNF- α , inflamatuvar süreç sırasında anjiyogenezi tetikleyen pek çok sinyal yolağını başlatmada rol oynamaktadır (Bigda ve ark., 2002). Ayrıca güçlü anjiyojenik aktiviteye sahip olan VEGF, yara iyileşmesi sırasında makrofajlar, endotel hücreleri, trombositler ve fibroblastlar tarafından büyük miktarlarda üretilmektedir (Gianni-Barrera ve ark., 2018).

Doku hasarının ayırt edici özellikleri olan hücre bozulması ve hipoksi, VEGF ve reseptörü gibi yara bölgesindeki anjiyogenik faktörlerin salınabilmeleri için güçlü başlangıç indükleyicileri gibi görünmektedir. VEGFR1'in kan damarı organizasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Bai ve ark., 2018).

Normal popülasyonda plazminojenin birincil fizyolojik inhibitörü olan PAI-1'in konjenital eksikliğinde, plazma PAI-1 konsantrasyonlarının 15 kat aralığında değiştiği bildirilmiştir (Declerck ve ark., 1988). Daha yüksek plazma PAI-1 seviyelerinin, plazminojen aktivatörlerinin fonksiyonel ömrünü kısaltarak ve fibrinolizi geciktirerek fibrin yıkımını geciktirdiği ve böylece anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir (Huber, 2001) Trombospondinler (TSP'ler), yüksek moleküler kütle ile salgılanan bir glikoprotein ailesi olup, yapılan çalışmalar ile TSP-1 ve TSP-2'nin güçlü antianjiyogenik faktörler olduğu ve bu nedenle kemik oluşumunda kan damarı organizasyonunun kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2004; Burr ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz kontrole göre yüksek PAI-1 ve TSP-1 düzeylerine ilişkin bulgularımız, hemofili hastalarında PAI-1 ve TSP-1'in anjiyogeneze katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir; ancak, PAI-1 seviyeleri ırk/etnik köken, cinsiyet, vücut kompozisyonundaki farklılıklar ve yağ dokusu dağılımına göre değişebildiği gibi, plazma PAI-1 konsantrasyonları, sabahın erken saatlerinde zirveye ulaşan bir sirkadiyen değişkenlik göstermektedir (Cesari ve ark., 2010). Bu nedenle, PAI-1 ve TSP-1 düzeylerindeki yükselmenin bir anjiyogeneze işareti olduğunu kesin olarak söylemek mümkün değildir. Ayrıca, çalışmaya dahil edilen hastaların hiçbirinin yakın zamanda herhangi bir kanama olayı bildirmemiş olmasına rağmen, söz konusu proteinlerin bu yüksek düzeyleri, yakın zamanda gelişen subklinik kanamayı da düşündürmektedir.

Anjiyogeneze süreci, endotel hücrelerinin göçü ve proliferasyonu ile yakından ilişkilidir. Çeşitli anjiyogenik ve inflamatuvar sitokinler de endotel hücrelerinin göçünde rol oynamaktadır (Weinlander ve ark., 2008; Norooznezhad ve ark., 2017). Van Meegeren ve ark. (2012) eklemdeki kanın doğal akış süresini taklit etmek için 4

gün boyunca IL-4 ile kana maruz bırakılan insan kondrosit kültürlerini analiz etmiş ve kondrositlerin kan kaynaklı apoptozunun IL-4 yoluyla sınırlandığını göstermiştir. Ayrıca, IL-4 tedavisinin kondrositlerin proteoglikan üretimini artırarak iyileşmeye katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Van Meegeren ve ark., 2012).

IL-4, esas olarak pro-inflamatuar fazı baskılayarak işlev gören bir anti-inflamatuar sitokindir. Ayrıca IL-4'ün kırıkta ve kemik bozulmasını ve ayrıca iltihaplanmayı engellediği bildirilmiştir (Joosten ve ark., 1999; Lubberts ve ark., 1999; Kageyama ve ark., 2004). Çalışmamızda, hemofili grubunda inflammatuar sitokin düzeyleri, kontrole göre anlamlı olarak artmış iken, IL-4 düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bu durum, eklemlerde sessiz, fakat devam eden inflammatuar durumun IL-4'ü uyarmak ya da düzenlemek için yeterli olmayabileceğini düşündürmüştür.

CD4⁺ T hücreleri ve yardımcı T hücrelerinin rol oynadığı konakçı hücre yanıtında, inflammatuar hastalıkların patogeneğinde ve immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Th1 hücreleri hücrel bağışıklık yanıtını stimüle eder, makrofaj aktivasyonunun inhibisyonuna katılır ve B hücrelerini IgM, IgG1 üretmesi için uyarır. Th2 ise, humoral immün yanıtı uyararak, B hücresi proliferasyonunu destekler ve antikor üretimini (IL-4) indükler. Ayrıca mast hücrelerinin ve eozinofilik lökositlerin farklılaşmasını ve çoğalmasını indükleyebilmektedir (Berger, 2000).

Normal şartlar altında vücutta Th1/Th2 hücrelerinin farklılaşması dengeli bir durumdadır ve Th1/Th2 hücrelerinin dengesinde olan değişiklikler hastalıkların ortaya çıkmasına zemin hazırlamaktadır (Romagnani, 2003). IL-12, Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki dengenin düzenlenmesi açısından kritik bir sitokindir. Bu nedenle doğal ve adaptif immün yanıtlar arasında bir köprü görevi görmesi açısından önemli bir rol oynar (Gately ve ark., 1998). Ayrıca IL-12, INF- γ üretimini ve proinflammatuar sitokinlerin salınımını indükler ve Th1 hücre farklılaşmasını başlatır.

Bununla birlikte, IL-12 ile indüklenen INF- γ üretimi, IL-4 tarafından down regüle edilir. Ayrıca IL-12'nin TNF- α 'ya kıyasla osteoklast fonksiyonu ve kemik rezorpsiyonunu inhibe edici etkileri olduğu bildirilmiştir (Lee ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda murin IL-12'nin neovaskülarizasyonunu inhibe ettiği ve IL-12'nin bu etkisinin IFN- γ ve IP-10 tarafından indüklendiği gösterilmiştir (Sgadari ve ark., 1996).

IL-12 anjiogenezi inhibe etme rol oynadığı ve hemofilide anjiyogenezin indüklendiği düşünüldüğünde, yaptığımız çalışmada IL-12 düzeylerinin kontrol grubuna düşük bulunması literatür ile uyumludur.

VEGFA'nın endotelial hücre proliferasyonunun indüklenmesinde, hücre göçünün teşvik edilmesinde ve apoptozun inhibe edilmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Zhang ve ark., 2016). Hipoksi ise genellikle inflamasyonun bir sonucudur ve güçlü bir VEGF indükleyicisidir (Giatromanolaki ve ark., 2003). HIF-1 damar oluşum kaskadında rol oynamaktadır. HIF-1 VEGF'in ana uyarıcısı olduğu için, HIF-1 etkisi ile ortaya çıkan anjiyogenez genellikle VEGF ile ilişkilendirilmektedir (Jozsef ve ark., 2019).

Endoglin ise neovaskülarizasyonunu gösteren belirteçlerden birisidir ve daha önceki çalışmalarda tümör endoglin ekspresyonun mikrodamar yoğunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kumar ve ark., 1999). Ayrıca endoglin ekspresyonunun vasküler yapıdaki değişiklikler, yara iyileşmesi ve inflamasyon gibi durumlarda arttığı gözlemlenmiştir (Tornsey ve ark., 2002). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda endoglinin, VEGF-A'nın neden olduğu hücre oluşumunu ve anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir. Böylece, endoglin ve VEGF, tümör anjiyogenez sürecinde önemli bir rolü olan proteinlerdir (Barbara ve ark., 2005).

Enflamatuar süreçlerde rol oynayan ve siklooksijenazların ana ürünü olan PGE-2'nin ise NO/cGMP yolunu aktive ederek anjiyogenezde modulator etkisi olduğu bildirilmiştir (Namkoong ve ark., 2005).

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular literatür ile uyumlu olarak hemofili hastalarında ENG, HIF-1 α , PGE-2 ve VEGFA'nın mRNA ekspresyonunun arttığını göstermektedir.

Annexin A5 (ANX5), anneksinler olarak adlandırılan kalsiyum ve fosfolipid bağlayıcı glukoprotein ailesinin bir üyesidir ve Ca²⁺ varlığında yüksek afinite ile negatif yüklü fosfolipitleri bağlayarak etki gösterir. ANX5'in işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte; protrombin ile fosfatidilserin bağlanma bölgeleri için rekabet ederek kan pıhtılaşmasının inhibisyonunda bir rol oynadığı ve ayrıca fosfolipaz A1'in aktivitesini inhibe ettiği öne sürülmüştür (Koopman ve ark., 1994).

AnxA5 ayrıca, antikoagülen olarak da etkisinin güçlü olduğu ortaya koyulmuş bir proteindir (Ida ve ark., 2004). Tomer et al. (2002), antifosfolipid sendromlu hastalarda akım sitometrisi tekniğini kullanarak, anti-trombosit anyonik fosfolipid antikorlarının (aPL) ANX5'in trombosit anyonik fosfolipidlere bağlanması üzerindeki etkisini incelemiştir. Yapılan bu çalışmalar ile hastanın antikorlarının, ANX5'in trombosit işlevine müdahale edip, trombosit prokoagülen aktivitesini artırdığı düşündürmektedir (Tomer ve ark., 2002). Araştırmacılar, ANX5'in, protrombin oluşumunda rol oynayan faktörler ile yarışmalı olarak trombosit anyonik fosfolipidleri üzerindeki prokoagülen aktiviteyi azalttığını bildirmiştir (Tomer A, 2002; Willems ve ark., 2000).

Ayrıca, yapılan araştırmalar, APS serumunun trombosit prokoagülen aktivitesini artırarak trombosit anyonik fosfolipidlere ANX5 bağlanmasını yaklaşık 16 kat azalttığını göstermiştir (Thiagarajan ve ark., 1990). Yapılan çalışmalarda Tip 1 diabetes mellitus hastalarında gözlenen trombotik komplikasyonlar ile ANX5 bağlanmasının azalması arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (Bakar ve ark., 2014). Çalışmamızda, hemofili hastalarında, kontrol gurupları ile kıyaslandığında; lenfositlere ANX5 bağlanmasının anlamlı oranda azalma gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular hemofili hastalarında gözlenen prokoagülen durum ile uyumludur.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Hemofilik artropatinin patofizyolojisi eklemden iltihaplanma ve katabolik süreçlerin gelişmesinden sorumlu mekanizmalar açısından tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitokinlerin, sitokin ağı olarak bilinen karmaşık bir sistemin bir parçası olarak hareket ettiklerinden, bu fenomeni teşvik etmede anahtar bir rol oynadıklarına inanılmaktadır. Bir inflamasyonun gelişmesinin, inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin biyolojik aktivitesi arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı öne sürülmektedir. (Hanada ve ark., 2002). Dengesizliği tetikleyen ve oluşturan ana faktör eklemden ortaya çıkan kan ve metabolitleridir. Tekrarlayan eklem kanaması atakları, eklemlerin ve eklem çevresindeki dokuların kademeli olarak dejenerasyonuna neden olan iltihaplanma süreçlerini güçlendirir. Sonuç olarak hastalar önemli ölçüde zarar görür ve ölüm oranı artar (Tagliaferri ve ark., 2010).

Mevcut tedavi yöntemleri ise; yeni ajanlar ve profilaktik faktör replasman tedavileri ile birlikte uzmanlaşmış ortopedik prosedürler ile uygulanmasını içerir (Berntorp ve ark., 2012). Bununla birlikte, yöntemler bazı durumlarda tamamen etkili ve tatmin edici görülmeyebilir (Shapiro ve ark., 2014). Aynı zamanda ortopedik prosedürler özgüllükleri nedeniyle yüksek bir perioperatif risk taşır ve geç yaşta yapıldığında kısa vadede bir rahatlama sağlasa bile, uzun vadeli bir çözüm getirmeyebilmektedir (Shapiro ve ark., 2014). Bu nedenle, hastalığın gelişimini önlemeye ve hemofilik artropatinin cerrahi tedavisinden kaçınmaya yardımcı olacak yeni sürdürülebilir tedaviler arayışına devam etmek önemlidir (Berntorp ve ark., 2003).

Bu tez çalışmasında, hemofili hastaları ve sağlıklı gönüllülerin plazma örneklerinde yeni tanımlanmış bir adipositokin olan endoglin protein düzeyi ile anjiyogenik ve inflamatuvar sitokinler arasındaki ilişki incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, hemofili hastalarında VEGF, ENG, TSP-1, ANG-2, PAI, IFN- α ve IFN- γ seviyeleri hemofili grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksek olduğu gösterilmiş, IL-12 düzeylerinin ise düşük olduğu saptanmıştır.

Gen ekspresyon çalışmaları sonucunda, hemofili hastalarında ENG, HIF-1 α , PGE-2 ve VEGFA'nın mRNA ekspresyonlarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca hemofili hastalarında ENG ile ANG-2 düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.

Hemofili hastalarında ENG düzeylerindeki artışın, ANG-2 ile anlamlı pozitif korelasyon göstermesi, söz konusu proteinlerin hemofilide anjiyogenez gelişiminde birlikte rol oynayabileceklerini düşündürmüştür. Ayrıca, VEGF geninin upregülasyonundan sorumlu VEGFA ve HIF-1 α ekspresyonundaki anlamlı artışa paralel olarak, hemofili hasta grubunda güçlü anjiyogenez promotörü VEGF'in plazma düzeyleri ve mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması sonucu elde edilen bulgular, ENG'nin hemofili hastalarında anjiyogenez gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir.

Günümüzde hemofili alanında çok önemli gelişmeler gösterilmeye devam etse de, eklem kanaması ve hemofilik artropati artışını öngörebilmek için kullanılacak biyobelirteçlerin araştırılmasının, uzun vadede hemofili hastalarının yaşam kalitesini belirlemede önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

Sitokin ağı içinde meydana gelen süreçlerin düzenlenmesi ve modülasyonunun sağlanmasının, hemofili hastalarının eklem sağlıklarının korunmasında çok umut verici olduğu düşünülmektedir. Hemofili hastalarının tedavilerini daha iyi bir noktaya taşımak için, hemofilik artropatide yer alan immünopatolojik mekanizmalar üzerinde etkili olan inflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için yapılacak daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Özellikle daha fazla sayıda ve geniş ölçekteki hasta popülasyonları, pediatrik ve erişkin olarak farklı yaş gruplarına göre ayrılmış hastalar ve aldıkları tedavi şekline ve çeşitli özelliklerine göre sınıflandırılmış hastaların değerlendirilmesi ile yapılacak çalışmalar adipositokinlerin hemofilik artropati ve

eklem sağlığı üzerindeki rolünün aydınlatılması için daha fazla katkı sağlayacaktır. Bununla birlikte, bu tez çalışması; ileride daha çok sayıda ve daha farklı özelliklerde çeşitli adipositokinlerin bu alandaki rolünün incelendiği çalışmalar ile desteklenip, genişletilebilir.

Bu tez çalışmasının, hemofilide farklı sitokin profiline bağlı olarak, artropati ve diğer komplikasyonlara yol açan inflamatuvar ve anjiyojenik süreçlerin rolünü aydınlatmak açısından bir başlangıç niteliği taşımakta olduğu ve daha ileri çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.



ÖZET

Hemofili Hastalarında Endoglin ve Çeşitli Anjiyogenik Faktörlerin İlişkisinin Değerlendirilmesi

Hemofilik artropati, çok sayıda ve tekrarlayan eklem içi kanamalar nedeniyle oluşan ve bunun sonucunda da eklemlerin normal yapısının bozulup, hareket kapasitesinin azalmasıyla eşlik eden bir durumdur. Hemofili hastaların yaşam kalitesini ciddi oranda etkileyen en önemli morbidite nedenlerinden biridir. Literatürde hemofili ve hemofilik artropati gelişimi ile ilgili çeşitli mekanizmalar ortaya konulmasına rağmen, yapılan daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalar inflamasyon ve anjiyogeneze rol oynayan ve yeni adipositokinler arasında yer alan endoglin proteinine dikkat çekmektedir. Endoglin proteininin tümör dokularında endotelyumda yüksek oranda eksprese olduğu ve anti-anjiyogenik tedavide etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda, bu çalışma Hemofili A ve B hastalarındaki endoglin düzeyleri ile anjiyogenetik faktörlerin ilişkisinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi pediatrik hematoloji kliniğinde tedavi gören Hemofili tanısı konmuş 27 hastadan toplanan plazma örnekleri kullanılmıştır. Hemofili hastaları ile aynı sayıda yaş ve cinsiyet bakımından benzer kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Toplanan plazma örneklerinde ELISA yöntemi ile ENG, VEGF, ANG-1/-2, IL-4 ve IL-12 düzeyleri belirlenmiştir. ELISA yöntemi sonuçlarına göre plazma endoglin düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında, hemofili hasta anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Ayrıca, çalışılan diğer adipositokinlerden VEGF, Angiopoietin-2, IFN- α ve IFN- γ düzeyleri ile, PAI-1 ve trombospondin-1 düzeyleri kıyaslandığında sonuçlar hemofili grubunda anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ($p<0,01$). Bu tez çalışmasında ENG ve ANG-2 düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiş ve bu da inflamasyon ve pıhtılaşma kaskadı üzerinde birbiri ile ilişkili olabileceklerini düşündürmüştür.

Bu çalışmada ayrıca, hastalarda ENG, HIF-1A, PGE-2, VEGFA ve VEGFR1 genlerinin mRNA ekspresyonu analiz edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Hemofili grubunda ENG, HIF-1A, PGE-2 ve VEGFA mRNA ekspresyon düzeylerindeki artış anlamlı bulunmuş, VEGFR'de anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Son olarak, bu çalışmada ayrıca, AnxV bağlanması incelenmiş ve AnxV'in platelet bağlanmasının kontrol grubuna kıyasla hemofili grubunda önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu tez çalışması, ENG proteininin hemofili hastalarında anjiyogeneze oluşumunda rol oynayabileceğini ve etkilerinin bu süreçte anjiyogenetik belirteç olan anjiyopoietin-2 ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Hemofili hastalarının tedavilerini daha iyi bir noktaya taşımak için, biyobelirteç olarak değerlendirilebilecek hedef sitokinlerin rolünün daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Bu çalışma ile hemofili hastalarında endoglinin rolü ilk kez incelenmiştir. Ayrıca gelecekte, hemofili hastalarında anjiyogenetik ve inflamatuvar faktörlerin rolünün altını çizmek için daha fazla sayıda hasta ve daha geniş sitokin çeşitliliği içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Ang-2, Anjiyogenetik Faktörler, Anjiyogeneze, Endoglin, Hemofili, Hemofilik artropati

SUMMARY

Evaluation of Endoglin and Various Angiogenic Factor Relationship in Patients with Haemophilia

Hemophilic arthropathy is a condition that occurs due to multiple and recurrent intra-articular hemorrhages, and the normal structure of the joints is disrupted and the range of motion is accompanied by a decrease in range of motion. Hemophilic arthropathy is important causes of morbidity that seriously affects the quality of life of patients. Although various mechanisms related to the development of hemophilia and hemophilic arthropathy have been revealed in the literature, more studies are needed. Recent studies have drawn attention to endoglin protein, which plays a role in inflammation and angiogenesis and is among the new adipocytokines. It is suggested that the endoglin protein is highly expressed in the endothelium of tumor tissues and may have an effect in anti-angiogenic therapy. In this study, the relation between endoglin levels and angiogenetic factors in patients with Hemophilia A and B was examined.

Within the scope of the study, plasma samples collected from 27 patients diagnosed with Hemophilia who were under the treatment of pediatric hematology clinic at Hacettepe University were used. The same number of age and gender-similar control groups as those of hemophilia patients were enclosed the study. ENG, VEGF, ANG-1/-2, IL-4 and IL-12 levels were determined in the collected plasma samples by ELISA method. According to the results of ELISA method, plasma endoglin level was found to be significantly higher in the hemophilia patient group than in the control group ($p < 0.0001$). In addition, VEGF, Angiopoietin-2, IFN- α and IFN- γ levels and PAI-1 and thrombospondin-1 levels were found to be significantly higher in the patient group rather than control group ($p < 0.01$). In this thesis study, a positive correlation was demonstrated with ENG and ANG-2 levels, suggesting that they may be related to each other on the inflammation and coagulation cascade.

In this study, the mRNA expression of ENG, HIF-1A, PGE 2, VEGFA and VEGFR1 genes in patients was analyzed. The increase in ENG, HIF-1A, PGE-2 and VEGFA mRNA expression levels were meaningfully increased in the hemophilia group, however no significant increase was observed in VEGFR. Finally, AnxV binding was also examined and it was demonstrated that, in comparison to control group, the platelet binding of AnxV was meaningfully reduced in the hemophilia group.

With this thesis, it was proposed that ENG protein can play a role in the generation of angiogenesis in patients with hemophilia and may be connected to the angiogenic factor, angiopoietin-2. In order to improve the treatment of hemophilia patients, it is important to further investigation of target cytokines, which can be considered as biomarkers. It was the first time with this study that efficacy of endoglin in hemophilia patients was analyzed. Furthermore, for the future studies, evaluation of larger number of patients and wider variety of ctyokines are needed to underline the role of angiogenetic and inflammatory factors in patients with hemophilia.

Keywords: Ang-2, Angiogenetic Factors, Angiogenesis, Endoglin, Hemophilia, Hemophilic arthropathy



KAYNAKLAR

- ABHINAND CS, RAJU R, SOUMYA SJ, ARYA PS, SUDHAKARAN PR (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling*, **10**: 347-354.
- ACHARYA SS (2012). Exploration of the pathogenesis of haemophilic joint arthropathy: understanding implications for optimal clinical management. *British Journal of Haematology*, **156**: 13-23.
- ACHARYA SS, KAPLAN RN, MACDONALD D, FABIYI OT, DIMICHELE D, LYDEN D (2011). Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **117**: 2484-2493.
- ADAMS JC, LAWLER J (2011). The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**(10):a009712. Published 2011 Oct 1. doi:10.1101/cshperspect.a009712
- AGAPIDOU A, STAVRAKIS T, VLACHAKI E, ANAGNOSTIS, VAKALOPOULOU S (2016). The Role of Angiogenesis in Haemophilic Arthropathy: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Turk J Haematol*, **33**: 88-93.
- ALAAEDDINE N, DI BATTISTA JA, PELLETIER JP, KIANSA K, CLOUTIER JM, MARTEL-PELLETIER J (1999). Inhibition of tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: Distinct targeting in the signaling pathways. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, **42**: 710-718.
- AGAPIDOU A, STAVRAKIS T, VLACHAKI E, ANAGNOSTIS P, VAKALOPOULOU S (2016). The Role of Angiogenesis in Haemophilic Arthropathy: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Turk J Haematol*, **33**: 88-93.
- AKWII RG, SAJIB MS, ZAHRA FT, MIKELIS CM (2019). Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells*, **8**: 471. Published 2019 May 17. doi:10.3390/cells8050471
- BACH RR (1988). Initiation of coagulation by tissue facto. *Critical Reviews in Biochemistry*, **23**: 339-368.
- BAEK A, KIM M, KIM SH, CHO S-R, KIM HJ (2018). Anti-inflammatory effect of DNA polymeric molecules in a cell model of osteoarthritis. *Inflammation*, **41**: 677-688.
- BAI Y, BAI L, ZHOU J, CHEN H, ZHANG L (2018). Sequential delivery of VEGF, FGF-2 and PDGF from the polymeric system enhance HUVECs angiogenesis in vitro and CAM angiogenesis. *Cellular Immunology*, **323**: 19-32.
- BAKAR F, ÜNLÜTÜRK U, BAŞKAL N, NEBİOĞLU S (2014). Annexin V Expression and Anti-Annexin V Antibodies in Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **99**: 932-937.

- PECE-BARBARA N, VERA S, KATHIRKAMATHAMBY K, LIEBNER S, DI GUGLIELMO GM, DEJANA E, WRANA JL, LETARTE M (2005). Endoglin null endothelial cells proliferate faster and are more responsive to transforming growth factor beta1 with higher affinity receptors and an activated Alk1 pathway. *J Biol Chem*, **280**: 27800-27808.
- BARLOW KD, SANDERS AM, SOKER S, ERGUN S, METHENY-BARLOW LJ (2013). Pericytes on the tumor vasculature: jekyll or hyde? *Cancer Microenvironment*, **6**: 1-17.
- BARNETT JM, SUAREZ S, McCOLLUM GW, PENN JS (2014). Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal-based models of retinal neovascularization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **55**: 6490-6498.
- BERNTORP E, MICHIELS JJ (2003). A healthy hemophilic patient without arthropathy: from concept to clinical reality. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, Copyright© by Thieme Medical Publishers, Inc, 333 Seventh Avenue, New ..., 005-010.
- BERNTORP E, SHAPIRO AD (2012). Modern haemophilia care. *The Lancet*, **379**: 1447-1456.
- BERNTORP E, DOLAN G, HAY C, LINARI S, SANTAGOSTINO E, TOSETTO A, CASTAMAN G, ÁLVAREZ-ROMÁN MT, PARRA LOPEZ R, OLDENBURG J, ALBERT T, SCHOLZ U, HOLMSTRÖM M, SCHVED JF, TROSSAËRT M, HERMANS C, BOBAN A, LUDLAM C, LETHAGEN S. (2017) European retrospective study of real-life haemophilia treatment. *Haemophilia*, **23**: 105-114.
- BERGER A (2000). Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*, **321**: 424. doi:10.1136/bmj.321.7258.424
- BHATTACHARJEE A, SHUKLA M, YAKUBENKO VP, MULYA A, KUNDU S, CATHCART MK (2013). IL-4 and IL-13 employ discrete signaling pathways for target gene expression in alternatively activated monocytes/macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, **54**: 1-16.
- BLANCHETTE V, KEY N, LJUNG L, MANCO-JOHNSON M, VAN DEN BERG H, SRIVASTAVA A (2014). Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, **12**: 1935.
- BIGDA J, OKRÓJ M (2002). The role of tumor necrosis factor (TNF) in angiogenesis. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, **6**: 57-59.
- BOTELLA LM, SÁNCHEZ-ELSNER T, SANZ-RODRIGUEZ F, KOJIMA S, SHIMADA J, GUERRERO-ESTEO M, COOREMAN MP, RATZIU V, LANGA C, VARY CP (2002). Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor- β signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood*, **100**: 4001-4010.
- BRINKMANN T, KÄHNERT H, PROHASKA W, NORDFANG O, KLEESIEK K (1994). Synthesis of tissue factor pathway inhibitor in human synovial cells and chondrocytes

- makes joints the predilected site of bleeding in haemophiliacs. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **32**: 313-317.
- BURR DB, GALLANT MA (2012). Bone remodelling in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, **8**: 665.
- CARMELIET P, STASSEN JM, SCHOONJANS L, REAM B, VAN DEN OORD JJ, DEMOL M, MULLIGAN RC, COLLEN D (1993). Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest*, **92**: 2756-2760.
- CARMELIET P, NG Y-S, NUYENS D, THEILMEIER G, BRUSSELMANS K, CORNELISSEN I, EHLE E, KAKKAR VV, STALMANS I, MATTOT V (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF 164 and VEGF 188. *Nature Medicine*, **5**: 495-502.
- CAO C, LAWRENCE DA, LI Y, VON ARNIM CA, HERZ J, SU EJ, MAKAROVA A, HYMAN BT, STRICKLAND DK, ZHANG L (2006). Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J*, **25**: 1860-1870.
- CARBAJO-LOZOYA J, LUTZ S, FENG Y, KROLL J, HAMMES HP, WIELAND T (2012). Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. *Cell Signal*. **24**: 1261-9.
- CESARI M, PAHOR M, INCALZI RA (2010). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther*, **28**: e72-91.
- CHEIFETZ, S, BELLÓN, T, CALÉS, C, VERA, S, BERNABEU, C, MASSAGUE, J LETARTE, M, 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 19027-19030.
- CHEUNG AH, STEWART RJ, MARSDEN PA (1998). Endothelial Tie2/Tek ligands angiopoietin-1 (ANGPT1) and angiopoietin-2 (ANGPT2): regional localization of the human genes to 8q22.3-q23 and 8p23. *Genomics*, **48**: 389-391.
- COLLINS P, BAUDO F, HUTH-KÜHNE A, INGERSLEV J, KESSLER CM, CASTELLANO MEM, SHIMA MST-LOUIS J, LÉVESQUE H (2010). Consensus recommendations for the diagnosis and treatment of acquired hemophilia A. *BMC Research Notes*, **3**: 161.
- COLMAN RW (2006). *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*: Lippincott Williams & Wilkins.
- COOPER AM, DALTON DK, STEWART TA, GRIFFIN JP, RUSSELL DG, ORME IM (1993). Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *The Journal of Experimental Medicine*, **178**: 2243-2247.

- CLAVEL G, BESSIS N, LEMEITER D, FARDELLONE P, MEJJAD O, MÉNARD J-F, POUPLIN S, BOUMIER P, VITTECOQ O, Le LOËT X, BOISSIER M-C (2007). Angiogenesis markers (VEGF, soluble receptor of VEGF and angiopoietin-1) in very early arthritis and their association with inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, **124**: 158-164.
- CROTEAU SE (2018). Evolving complexity in hemophilia management. *Pediatric Clinics*, **65**: 407-425.
- DALY CAD S, inventor; Use of angiopoietins in promoting blood coagulation and in the treatment of blood coagulation disorders WO/2017/079556. patent application PCT/US2016/060527. 2017.
- DAVIE EW, FUJIKAWA K, KISIEL W (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, **30**: 10363-10370.
- DECLERCK PJ, ALESSI M, VERSTREKEN M, KRUIHOF EK, JUHAN-VAGUE I, COLLEN D (1988). Measurement of plasminogen activator inhibitor 1 in biologic fluids with a murine monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood*, **71**: 220-225.
- DERÏSİ J, PENLAND L, BROWN PO, BITTNER ML, MELTZER PS, RAY M, CHEN Y, SU YA, TRENT JM (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, **14**: 457-60.
- DIEVAL J, NGUYEN G, GROSS S, DELOBEL J, KRUIHOF E (1991). A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood*, **77**: 528-532.
- EHRENFORTH S, KREUZ W, LINDE R, FUNK M, GÜNGÖR T, KRACKHARDT B, KORNHUBER B, SCHARRER I (1992). Incidence of development of factor VIII and factor IX inhibitors in haemophiliacs. *The Lancet*, **339**: 594-598.
- ENGVALL E, PERLMANN P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, **8**: 871-4.
- ENGVALL E (2010). The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*, **56**: 319-20.
- FERRARA N, HOUCK K, JAKEMAN L, LEUNG DW (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Reviews*, **13**: 18-32.
- FISCHER K, COLLINS P, BJÖRKMAN S, BLANCHETTE V, OH M, FRITSCH S, SCHROTH P, SPOTTS G, EWENSTEIN B (2011). Trends in bleeding patterns during prophylaxis for severe haemophilia: observations from a series of prospective clinical trials. *Haemophilia*, **17**: 433-438.
- FOLKMAN J (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med*, **57**: 1-18.

- FORSYTH A, RIVARD GÉ, VALENTINO L, ZOURIKIAN N, HOFFMAN M, MONAHAN P, VAN MEEGEREN M, FORRIOL F (2012). Consequences of intra-articular bleeding in haemophilia: science to clinical practice and beyond. *Haemophilia*, **18**: 112-119.
- FRANCHINI M, MANNUCCI PM (2013). Hemophilia A in the third millennium. *Blood Reviews*, **27**: 179-184.
- FU J, ZHANG L, SONG S, SHENG K, LI Y, LI P, SONG S, WANG Q, CHU J, WEI W (2014). Effect of bone marrow-derived CD11b⁺ F4/80⁺ immature dendritic cells on the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis. *Inflammation Research*, **63**: 357-367.
- FURUKAWA Y, PAGON R, BIRD T, DOLAN C, STEPHENS K (1993). GeneReviews.
- GAILANI D, RENNÉ T (2007). The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost*, **5**: 1106-1112.
- GATTI R, BELLETTI S, ORLANDINI G, BUSSOLATI O, DALL'ASTA V, GAZZOLA G C (1998). Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **46**: 895-900.
- GIANNI-BARRERA R, BUTSCHKAU A, UCCELLI A, CERTELLI A, VALENTE P, BARTOLOMEO M, GROPPA E, BURGER M, HLUSHCHUK R, HEBERER M (2018). PDGF-BB regulates splitting angiogenesis in skeletal muscle by limiting VEGF-induced endothelial proliferation. *Angiogenesis*, **21**: 883-900.
- GIATROMANOLAKI A, SIVRIDIS E, MALTEZOS E, ATHANASSOU N, PAPAZOGLOU D, GATTER KC, HARRIS AL, KOUKOURAKIS MI (2003). Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, **5**: R193-201.
- GOUGOS A, LETARTE M (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *The Journal of Immunology*, **141**: 1925-1933.
- GOUMANS M-J, MUMMERY C (2002). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *International Journal of Developmental Biology*, **44**: 253-265.
- GOUMANS M-J, VALDIMARSDOTTIR G, ITOH S, LEBRIN F, LARSSON J, MUMMERY C, KARLSSON S, TEN DIJKE P (2003). Activin receptor-like kinase (ALK) 1 is an antagonistic mediator of lateral TGFβ/ALK5 signaling. *Molecular Cell*, **12**: 817-828.
- GRINGERI A, EWENSTEIN B, REININGER A (2014). The burden of bleeding in haemophilia: is one bleed too many? *Haemophilia*, **20**: 459-463.
- GUTTERMAN JU (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**: 1198-1205.

- HADDOW JE, PALOMAKI GE, ALLAN WC, WILLIAMS JR, KNIGHT GJ, GAGNON J, O'HEIR CE, MITCHELL ML, HERMOS RJ, WAISBREN SE (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine*, **341**: 549-555.
- HAN Y, REN J, BAI Y, PEI X, HAN Y (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **109**: 59-68.
- HANADA T, YOSHIMURA A (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **13**: 413-421.
- HELLSTRÖM M, PHNG LK, GERHARDT H (2007). VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr*, **1**: 133-136.
- HIGUCHI R, FODDER C, DOLLINGER G, WATSON R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, **11**: 1026.
- HOFFMAN M (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **16**: 17-20.
- HOFFMAN R, BENZ JR EJ, SILBERSTEIN LE, HESLOP H, ANASTASI J, WEITZ J (2013). *Hematology: basic principles and practice*: Elsevier Health Sciences.
- HOUCK KA, LEUNG D, ROWLAND A, WINER J, FERRARA N (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 26031-26037.
- HUANG S-I, HENDRIKS W, ALTHAGE A, HEMMI S, BLUETHMANN H, KAMIJO R, VILCEK J, ZINKERNAGEL RM, AGUET M (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, **259**: 1742-1745.
- HUANG Y-J, NAN G-X (2019). Oxidative stress-induced angiogenesis. *Journal of Clinical Neuroscience*, **63**: 13-16.
- HUBER K (2001). Plasminogen activator inhibitor type-1 (part two): role for failure of thrombolytic therapy. PAI-1 resistance as a potential benefit for new fibrinolytic agents. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **11**: 195-202.
- HUTCHINGS H, ORTEGA N, PLOUËT J (2003). Extracellular matrix- bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *The FASEB Journal*, **17**: 1-27.
- IMAMAKI R, OGAWA K, KIZUKA Y, KOMI Y, KOJIMA S, KOTANI N, HONKE K, HONDA T, TANIGUCHI N, KITAZUME S (2018). Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2-β3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene*, **37**: 4287-4299.
- IDA M, SATOH A, MATSUMOTO I, KOJIMA-AIKAWA K (2004). Human annexin V binds to sulfatide: contribution to regulation of blood coagulation. *J Biochem*, **135**: 583-588.

- INDRACCOLO S, PFEFFER U, MINUZZO S, ESPOSITO G, RONI V, MANDRUZZATO S, FERRARI N, ANFOSSO L, DELL'EVA R, NOONAN DM, CHIECO-BIANCHI L, ALBINI A, AMADORI A (2007). Identification of genes selectively regulated by IFNs in endothelial cells. *J Immunol*, **178**: 1122-1135.
- ISHII H, TANAKA H, KATOH K, NAKAMURA H, NAGASHIMA M, YOSHINO S (2002). Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **10**: 277-281.
- JEANSSON M, GAWLIK A, ANDERSON G, LI C, KERJASCHKI D, HENKELMAN M, QUAGGIN SE. (2011). Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest*, **121**: 2278-2289.
- JIANG H, HARRIS MB, ROTHMAN P (2000). IL-4/IL-13 signaling beyond Jak/Stat. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **105**: 1063-1070.
- JIN Y, MUHL L, BURMAKIN M, WANG Y, DUCHEZ A-C, BETSHOLTZ C, ARTHUR HM, JAKOBSSON L (2017). Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. *Nature Cell Biology*, **19**: 639-652.
- JOOSTEN LA, LUBBERTS E, HELSEN MM, SAXNE T, COENEN-DE ROO CJ, HEINEGÅRD D, VAN DEN BERG WB (1999). Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res*, **1**: 81-91.
- JONKER L, ARTHUR HM (2002). Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mechanisms of Development*, **110**: 193-196.
- JOZSEF JASZAI, J. VE SCHMIDT, M. H. H. (2019). Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies. *Cells*, **8**: 1102.
- KAGEYAMA Y, KOIDE Y, UCHIJIMA M, NAGATA T, YOSHIDA A, TAIKI A, MIURA T, NAGAFUSA T, NAGANO A (2004). Plasmid encoding interleukin-4 in the amelioration of murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **50**: 968-975.
- KAMMERTOENS T, FRIESE C, ARINA A, IDEL C, BRIESEMEISTER D, ROTHE M, IVANOV A, SZYMBORSKA A, PATONE G, KUNZ S, SOMMERMEYER D, ENGELS B, LEISEGANG M, TEXTOR A, FEHLING HJ, FRUTTIGER M, LOHOFF M, HERRMANN A, YU H, WEICHSELBAUM R, UCKERT W, HÜBNER N, GERHARDT H, BEULE D, SCHREIBER H, BLANKENSTEIN T (2017). Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature*, **4**: 545(7652), 98-102.
- KAR A, PHADNIS S, DHARMARAJAN S, NAKADE J (2014). Epidemiology & social costs of haemophilia in India. *The Indian Journal of Medical Research*, **140**: 19.
- KHUU LA, TAYYARI F, SIVAK JM, FLANAGAN JG, SINGER S, BRENT MH, HUANG D, TAN O, HUDSON C (2017). Aqueous humour concentrations of TGF- β , PLGF and FGF- 1 and total retinal blood flow in patients with early non-proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmologica*, **95**: e206-e211.

- KIENAST Y, KLEIN C, SCHEUER W, RAEMSCH R, LORENZON E, BERNICKE D, HERTING F, YU S, THE HH, MARTARELLO L, GASSNER C, STUBENRAUCH KG, MUNRO K, AUGUSTIN HG, THOMAS M (2013). Ang-2-VEGF-A CrossMab, a novel bispecific human IgG1 antibody blocking VEGF-A and Ang-2 functions simultaneously, mediates potent antitumor, antiangiogenic, and antimetastatic efficacy. *Clin Cancer Res*, **19**: 6730-6740.
- KIM AH, KHURSIGARA G, SUN X, FRANKE TF, CHAO MV (2001a). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, **21**: 893-901.
- KIM M, ALLEN B, KORHONEN EA, NITSCHKÉ M, YANG HW, BALUK P, SAHARINEN P, ALITALO K, DALY C, THURSTON G, MCDONALD DM (2016). Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation. *J Clin Invest*, **126**: 3511-3525.
- KISELEVA RY, GREINER C, VILLA C, MARCOS-CONTRERAS O, HOOD E, SHUVAEV V, DELISSER H, MUZYKANTOV V (2018). Vascular endothelial effects of collaborative binding to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). *Scientific Reports*, **8**: 1-10.
- KNOEBL P, MARCO P, BAUDO F, COLLINS P, HUTH-KÜHNE A, NEMES L, PELLEGRINI F, TENGBORN L, LEVESQUE H, CONTRIBUTORS ER (2012). Demographic and clinical data in acquired hemophilia A: results from the European Acquired Haemophilia Registry (EACH2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**: 622-631.
- KOMMINENI VK, NAGINENI CN, WILLIAM A, DETRICK B, HOOKS JJ (2008). IFN-gamma acts as anti-angiogenic cytokine in the human cornea by regulating the expression of VEGF-A and sVEGF-R1. *Biochem Biophys Res Commun*, **374**: 479-484.
- KONKLE B, JOSEPHSON N, NAKAYA FLETCHER S (1993). Hemophilia A. 2000 Sep 21 [Updated 2014 Jun 5]. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.
- KOOPMAN G, REUTELINGSPERGER CP, KUIJTEN GA, KEEHNEN RM, PALS ST, VAN OERS MH (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**: 1415-1420.
- KUBISTA M, ANDRADE JM, BENGTSSON M, FOROOTAN A, JONÂK J, LIND K, SINDELKA R, SJOBACK R, SJOGREEN B, STROMBOM L, STÅHLBERG A, ZORIC N (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects Medicine*, **27**: 95-125.
- KUMAR R, CARCAO M (2013). Inherited abnormalities of coagulation: hemophilia, von Willebrand disease, and beyond. *Pediatric Clinics*, **60**: 1419-1441.
- KUMAR P, WANG JM, BERNABEU C (1996). CD 105 and angiogenesis. *J Pathol*, **178**: 363.

- LAFEBER FP, MIOSSEC P, VALENTINO LA (2008). Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*, **14**: 3-9.
- LAINER-CARR D, BRAHN E (2007). Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, **3**: 434-442.
- LAKKA KLEMENT G, YIP T-T, CASSIOLA F, KIKUCHI L, CERVI D, PODUST V, ITALIANO JE, WHEATLEY E, ABOU-SLAYBI A, BENDER E (2009). Platelets actively sequester angiogenesis regulators. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **113**: 2835-2842.
- LEBRIN F, GOUMANS MJ, JONKER L, CARVALHO RL, VALDIMARSDOTTIR G, THORIKAY M, MUMMERY C, ARTHUR HM, DIJKE PT (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*, **23**: 4018-4028.
- LEE C, KESSLER C, VARON D, MARTINOWITZ U, HEIM M, LILICRAP D (1998). The molecular basis of haemophilia B. *Haemophilia: State of the Art*, **4**: 350-357.
- LEE SK, LORENZO J (2006). Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol*, **18**: 411-418.
- LEIK CE, SU EJ, NAMBI P, CRANDALL DL, LAWRENCE DA (2006). Effect of pharmacologic plasminogen activator inhibitor-1 inhibition on cell motility and tumor angiogenesis. *J Thromb Haemost*, **4**: 2710-2715.
- LIANG S, YU H, CHEN X, SHEN T, CUI Z, ZHANG J, CHENG Y, JIA S, SONG S, ZHANG X (2017). PDGF-BB/KLF4/VEGF signaling axis in pulmonary artery endothelial cell angiogenesis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **41**: 2333-2349.
- LUBBERTS E, JOOSTEN LA, VAN DEN BERSSELAAR L, HELSEN MM, BAKKER AC, VAN MEURS JB, GRAHAM FL, RICHARDS CD, VAN DEN BERG WB (1999). Adenoviral vector-mediated overexpression of IL-4 in the knee joint of mice with collagen-induced arthritis prevents cartilage destruction. *J Immunol*, **163**: 4546-4556.
- LUCK JV JR, SILVA M, RODRIGUEZ-MERCHAN EC, GHALAMBOR N, ZAHIRI CA, FINN RS (2004). Hemophilic arthropathy. *J Am Acad Orthop Surg*, **12**: 234-245.
- MAISONPIERRE PC, SURI C, JONES PF, BARTUNKOVA S, WIEGAND SJ, RADZIEJEWSKI C, COMPTON D, MCCLAIN J, ALDRICH TH, PAPADOPOULOS N, DALY TJ, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, **277**: 55-60.
- MACKMAN N. (2009) The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth Analg*, **108**: 1447-1452.
- MANN KG (2003). Thrombin formation. *Chest*, **124**: 4S-10S.

- MANNUCCI P, BAUER K, GRINGERI A, BARZEGAR S, SANTAGOSTINO E, TRADATI F, ROSENBERG R (1991). No activation of the common pathway of the coagulation cascade after a highly purified factor IX concentrate. *British Journal of Haematology*, **79**: 606-611.
- MANNUCCI P, FRANCHINI M (2013). Is haemophilia B less severe than haemophilia A? *Haemophilia*, **19**: 499-502.
- MCALLISTER K, GROGG K, JOHNSON DW, GALLIONE C, BALDWIN M, JACKSON C, HELMBOLD E, MARKEL D, MCKINNON W, MURREL J (1994). Endoglin, a TGF- β binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genetics*, **8**: 345-351.
- MCKUSICK VA (2007). Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *The American Journal of Human Genetics*, **80**: 588-604.
- MEYER M, CLAUSS M, LEPPLE-WIENHUES A, WALTENBERGER J, AUGUSTIN HG, ZICHE M, LANZ C, BÜTTNER M, RZIHA HJ, DEHIO C (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR- 1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, **18**: 363-374.
- MILETICH JP, BROZE JR GJ, MAJERUS PW (1980). The synthesis of sulfated dextran beads for isolation of human plasma coagulation factors II, IX, and X. *Analytical Biochemistry*, **105**: 304-310.
- MINOWA H, TAKAHASHI Y, TANAKA T, NAGANUMA K, IDA S, MAKI I, YOSHIOKA A (1999). Four cases of bleeding diathesis in children due to congenital plasminogen activator inhibitor-1 deficiency. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, **29**: 286-291.
- MOFID M, SADRAIE SH, IMANI H, TORKAMAN G, KAKA G, NAGHII MR, ALISHIRI G, ASADI MH (2015). The Effect of mesenchymal stem cells and aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* on the mechanical properties of articular cartilage in an experimental model of rat osteoarthritis. *Anatomical Sciences Journal*, **12**: 68-74.
- MONROE DM, HOFFMAN M (2006). What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **26**: 41-48.
- MORRIS AH, KYRIAKIDES TR (2014). Matricellular proteins and biomaterials. *Matrix Biology*, **37**: 183-191.
- MUELLER TD, ZHANG J-L, SEBALD W, DUSCHL A (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1592**: 237-250.
- MULDER K, LLINÁS A (2004). The target joint. *Haemophilia*, **10**: 152-156.
- MUPPALA S, XIAO R, KRUKOVETS I, VERBOVETSKY D, YENDAMURI R, HABIB N, RAMAN P, PLOW E, STENINA-ADOGNRAVI O (2017). Thrombospondin-4 mediates TGF- β -induced angiogenesis. *Oncogene*, **36**: 5189-5198.

- NADAR SK, KARALIS I, AL YEMENI E, BLANN AD, LIP GY (2005). Plasma markers of angiogenesis in pregnancy induced hypertension. *Thrombosis and Haemostasis*, **94**: 1071-1076.
- NIEUWENHUIZEN L, ROOSENDAAL G, COELEVELD K, LUBBERTS E, BIESMA DH, LAFEVER FP, SCHUTGENS RE (2013). Haemarthrosis stimulates the synovial fibrinolytic system in haemophilic mice. *Thrombosis and Haemostasis*, **110**: 173-183.
- NOROOZNEZHAD AH, NOROOZNEZHAD F (2017). Cannabinoids: Possible agents for treatment of psoriasis via suppression of angiogenesis and inflammation. *Med Hypotheses*, **99**: 15-18.
- NURDEN A, NURDEN P (2011). Advances in our understanding of the molecular basis of disorders of platelet function. *J Thromb Haemost.*, **Suppl 1**: 76-91.
- OUYANG W, RUTZ S, CRELLIN NK, VALDEZ PA, HYMOWITZ SG (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual Review of Immunology*, **29**: 71-109.
- ØVLISEN K, KRISTENSEN AT, JENSEN AL, TRANHOLM M (2009). IL- 1 β , IL- 6, KC and MCP- 1 are elevated in synovial fluid from haemophilic mice with experimentally induced haemarthrosis. *Haemophilia*, **15**: 802-810.
- PADDOCK, M CHAPIN J (2016). Bleeding diatheses: approach to the patient who bleeds or has abnormal coagulation. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **43**: 637-650.
- PARK YW, KANG YM, BUTTERFIELD J, DETMAR M, GORONZY JJ, WEYAND CM (2004). Thrombospondin 2 functions as an endogenous regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *The American Journal of Pathology*, **165**: 2087-2098.
- PEPPER M, FERRARA N, ORCI L, MONTESANO R (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **181**: 902-906.
- PEYVANDI F, GARAGIOLA I, YOUNG G (2016). The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet*, **388**: 187-197.
- RAGNI MV (2012). Hemorrhagic disorders: coagulation factor deficiencies. *Goldman's Cecil Medicine*. Elsevier, e34-e43.
- RATTNER A, WILLIAMS J, NATHANS J (2019). Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *The Journal of Clinical Investigation*, **129**: 3807-3820.
- RENZ H (1999). Soluble interleukin-4 receptor (sIL-4R) in allergic diseases. *Inflammation Research*, **48**: 425-431.

- REPSOLD L, POOL R, KARODIA M, TINTINGER G, JOUBERT AM (2017). An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Cell International*, **17**: 1-12.
- RODRIGUEZ-MERCHAN EC (2016). Intra-articular injections of mesenchymal stem cells (MSCs) as a treatment for hemophilic arthropathy. *Expert Review of Hematology*, **9**: 737-741.
- ROMAGNANI S (2003). Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States [J]. *Annual Review of Immunology*, **12**: 227-257.
- ROOSENDAAL G, LAFEVER F (2006). Pathogenesis of haemophilic arthropathy. *Haemophilia*, **12**: 117-121.
- SAHARINEN P, EKLUND L, ALITALO K (2017). Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov.*, **16**: 635-661.
- SALVEN P, LYMBOUSSAKI A, HEIKKILÄ P, JÄÄSKELA-SAARI H, ENHOLM B, AASE K, VON EULER G, ERIKSSON U, ALITALO K, JOENSUU H (1998). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *The American Journal of Pathology*, **153**: 103-108.
- SAKAMOTO, S., PUTALUN, W., VIMOLMANGKANG, S., PHOOLCHAROEN, W., SHOYAMA, Y., TANAKA, H., & MORIMOTO, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, **72**: 32-42.
- SBOROV DW, RODGERS GM (2012). Acquired hemophilia A: a current review of autoantibody disease. *Clin Adv Hematol Oncol.*, **10**: 19-27.
- SCHENONE M, FURIE BC, FURIE B (2004). The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol.*, **11**: 272-277.
- SCHOLZ A, PLATE K.H, REISS Y (2015). Angiopoietin-2: A multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.*, **1347**: 45-51.
- SCHOONDERWOERD MJA, GOUMANS MTH, HAWINKELS LJAC (2020). Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*, **10**: 289.
- SCHUERWEGH A, DOMBRECHT E, STEVENS W, VAN OFFEL J, BRIDTS C, DE CLERCK L (2003). Influence of pro-inflammatory (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis and Cartilage*, **11**: 681-687.
- SCHULDT EA, LIEB W, DORR M, LERCH M.M, VOLZKE H, NAUCK M, FRIEDRICH N (2018). Circulating angiopoietin-2 and its soluble receptor Tie-2 concentrations are related to inflammatory markers in the general population. *Cytokine*, **105**: 1-7.
- SENGER DR, CLAFFEY KP, BENES JE, PERRUZZI CA, SERGIOU AP, DETMAR M (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation

- through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**: 13612-13617.
- SHAPIRO A, AKINS S, COOPER D (2014). Long- term outcomes from orthopaedic surgery in haemophilia: are we measuring success and documenting and assessing complications? *Haemophilia*, **20**: e367-e371.
- SHETTY S, BHAVE M, GHOSH K (2011). Acquired hemophilia A: Diagnosis, aetiology, clinical spectrum and treatment options. *Autoimmun Rev.*, **11**: 74.
- SHPIILBERG O, PERETZ H, ZIVELIN A, YATUV R, CHETRIT A, KULKA T, STERN C, WEISS E, SELIGSOHN U (1995). One of the two common mutations causing factor XI deficiency in Ashkenazi Jews (type II) is also prevalent in Iraqi Jews, who represent the ancient gene pool of Jews. *Blood*, Jan 15, **85**: 429-32.
- SGADARI C, ANGIOLILLO AL, TOSATO G (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood*, **87**: 3877-3882.
- SIEDLECKI J, WERTHEIMER C, WOLF A, LIEGL R, PRIGLINGER C, PRIGLINGER S, EIBL-LINDNER K (2017). Combined VEGF and PDGF inhibition for neovascular AMD: anti-angiogenic properties of axitinib on human endothelial cells and pericytes in vitro. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, **255**: 963-972.
- SILVEIRA AC, SANTANA MA, RIBEIRO IG, CHAVES DG, MARTINS-FILHO OA (2015). The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors. *BMC Hematology*, **15**: 1.
- SOUCIE JM, EVATT B, JACKSON D, INVESTIGATORS HSSP (1998). Occurrence of hemophilia in the United States. *American Journal of Hematology*, **59**: 288-294.
- SRIVASTAVA A, BREWER A, MAUSER-BUNSCHOTEN E, KEY N, KITCHEN S, LLINAS A, LUDLAM C, MAHLANGU J, MULDER K, POON M (2013). Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia*, **19**: e1-e47.
- STALMANS I, NG Y-S, ROHAN R, FRUTTIGER M, BOUCHÉ A, YUCE A, FUJISAWA H, HERMANS B, SHANI M, JANSEN S (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *The Journal of Clinical Investigation*, **109**: 327-336.
- STEPHENSON D, TAIT R, BRODIE N, COLLINS P, CHEAL R, KEELING D, MELTON K, DOLAN G, HAYE H, HAYMAN E (2009). Changing patterns of bleeding in patients with severe haemophilia A. *Haemophilia*, **15**: 1210-1214.
- SURI C, JONES PF, PATAN S, BARTUNKOVA S, MAISONPIERRE PC, DAVIS S, SATO TN, YANCOPOULOS GD (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, **87**: 1171-1180.
- SZEKANECZ Z, KOCH AE (2001). Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol.*, **13**: 202-208.

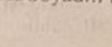
- SZEKANECZ Z, KOCH AE (2007). Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, **3**: 635-643.
- TAGLIAFERRI A, RIVOLTA G, IORIO A, OLIOVECCHIO E, MANCUSO M, MORFINI M, ROCINO A, MAZZUCCONI M, FRANCHINI M, CENTERS IAOH (2010). Mortality and causes of death in Italian persons with haemophilia, 1990-2007. *Haemophilia*, **16**: 437-446.
- TAKAHASHI S (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull.*, **34**: 1785-1788.
- TATTERSALL IW, DU J, CONG Z, CHO BS, KLEIN AM, DIECK CL, CHAUDHRI RA, CUERVO H, HERTS JH, KITAJEWSKI J (2016). In vitro modeling of endothelial interaction with macrophages and pericytes demonstrates Notch signaling function in the vascular microenvironment. *Angiogenesis*, **19**: 201-15.
- TAYLOR PC, SIVAKUMAR B (2005). Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.*, **17**: 293-298.
- TIAN H, HUANG JJ, GOLZIO C, GAO X, HECTOR-GREENE M, KATSANIS N, BLOBE GC (2018) Endoglin interacts with VEGFR2 to promote angiogenesis. *FASEB J.*, **32**: 2934-2949.
- TISCHER E, GOSPODAROWICZ D, MITCHELL R, SILVA M, SCHILLING J, LAU K, CRISP T, FIDDES JC, ABRAHAM JA (1989). Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **165**: 1198-1206.
- THIAGARAJAN P, TAIT JF (1990). Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem.*, **265**: 17420-17423.
- TODOROVA D, SIMONCINI S, LACROIX R, SABATIER F, DIGNAT-GEORGE F (2017). Extracellular vesicles in angiogenesis. *Circulation Research*, **120**: 1658-1673.
- TOMER A (2002). Antiphospholipid antibody syndrome: rapid, sensitive, and specific flow cytometric assay for determination of anti-platelet phospholipid autoantibodies. *J Lab Clin Med.*, **139**: 147-154.
- TORSNEY E, CHARLTON R, PARUMS D, COLLIS M, ARTHUR HM (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo. *Inflamm Res.*, **51**: 464-470.
- THIAGARAJAN P, TAIT JF (1990). Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem.*, **265**: 17420-17423.
- TÜRK HEMATOLOJİ DERNEĞİ, (2011). Hemofili Tanı ve Tedavi Kılavuzu.
- VALENTINO LA (2010). Blood-induced joint disease: the pathophysiology of hemophilic arthropathy. *J Thromb Haemost.*, **8**: 1895-902.

- VAN MEEGEREN M (2012). Blood-induced joint damage: novel targets for therapy.
- VAN MEEGEREN ME, ROOSENDAAL G, JANSSEN NW, WENTING MJ, VAN WESEL AC, VAN ROON JA, LAFFEBER FP (2012). IL-4 alone and in combination with IL-10 protects against blood-induced cartilage damage. *Osteoarthritis and Cartilage*, **20**: 764-772.
- VENKATESHA S, TOPORSIAN M, LAM C, HANAI J-I, MAMMOTO T, KIM YM, BDOLAH Y, LIM K-H, YUAN H-T LIBERMANN TA (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, **12**: 642-649.
- VIGNALI DA, KUCHROO VK (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*, **13**: 722.
- VON MARSCHALL Z, SCHOLZ A, CRAMER T, SCHÄFER G, SCHIRNER M, ÖBERG K, WIEDENMANN B, HÖCKER M, ROSEWICZ S (2003). Effects of Interferon Alpha on Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription and Tumor Angiogenesis, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, **95**: 437-448.
- VOS L, SCHUTGENS R, DE VALK H, SPIERING W, BEMELMANS R (2016). A patient with severe haemophilia A and multiple arterial thromboses caused by large vessel vasculitis: a case report. *Haemophilia*, **22**: e39-e42.
- WANG Z-F, LIAO F, WU H, DAI J (2019). Glioma stem cells-derived exosomal miR-26a promotes angiogenesis of microvessel endothelial cells in glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **38**: 201.
- WEINLANDER K, NASCHBERGER E, LEHMANN MH, TRIPAL P, PASTER W, STOCKINGER H, HOHENADL C, STÜRZL M (2008). Guanylate binding protein-1 inhibits spreading and migration of endothelial cells through induction of integrin alpha4 expression. *FASEB J.*, **22**: 4168-4178.
- WHITE GN (2001). Factor VIII and Factor IX Subcommittee. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost.*, **85**: 560.
- WIGHT J, PAISLEY S (2003). The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia*, **9**: 418-435.
- WILLEMS GM, JANSSEN MP, COMFURIUS P, GALLI M, ZWAAL RF, BEVERS EM (2000). Competition of annexin V and anticardiolipin antibodies for binding to phosphatidylserine containing membranes. *Biochemistry*, **39**: 1982-1989.
- WITZENBICHLER B, ASAHARA T, MUROHARA T, SILVER M, SPYRIDOPOULOS I, MAGNER M, PRINCIPE N, KEARNEY M, HU J-S, ISNER JM (1998). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *The American Journal of Pathology*, **153**: 381-394.

- WOJTUKIEWICZ MZ, SIERKO E, HEMPEL D, TUCKER SC, HONN KV (2017). Platelets and cancer angiogenesis nexus. *Cancer and Metastasis Reviews*, **36**: 249-262.
- WYSEURE T, COOKE EJ, DECLERCK PJ, BEHRENDT N, MEIJERS JC, VON DRYGALSKI A, MOSNIER LO (2018). Defective TAFI activation in hemophilia A mice is a major contributor to joint bleeding. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, **132**: 1593-1603.
- WYSEURE T, MOSNIER LO, VON DRYGALSKI A (2016). Advances and challenges in hemophilic arthropathy. *Seminars in Hematology*, **53**: 10-19.
- WYSOCZYNSKI M, PATHAN A, MOORE JB, FARID T, KIM J, NASR M, KANG Y, LI H, BOLLI R (2019). Pro-Angiogenic actions of CMC-derived extracellular vesicles rely on selective packaging of Angiopoietin 1 and 2, but not FGF-2 and VEGF. *Stem Cell Reviews and Reports*, **15**: 530-542.
- YORIMITSU M, NISHIDA K, SHIMIZU A, DOI H, MIYAZAWA S, KOMIYAMA T, NASU Y, YOSHIDA A, WATANABE S, OZAKI T (2008). Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, **16**: 764-771.
- YOSHIJI H, KURIYAMA S, NOGUCHI R, YOSHII J, IKENAKA Y, YANASE K, NAMISAKI T, KITADE M, UEMURA M, MASAKI T, FUKUI H (2005). Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice. *Gut*, **54**: 1768-1775.
- ZETTERBERG E, PALMBLAD J, WALLENSTEN R, MORFINI M, MELCHIORRE D, HOLMSTRÖM M (2014). Angiogenesis is increased in advanced haemophilic joint disease and characterised by normal pericyte coverage. *European Journal of Haematology*, **92**: 256-262.
- ZHANG B, QIANGBA Y, SHANG P, LU Y, YANG Y, WANG Z, ZHANG H (2016). Gene expression of vascular endothelial growth factor A and hypoxic adaptation in Tibetan pig. *J Animal Sci Biotechnol.*, **7**: 21.

EKLER

EK-1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Raporu

KLİNİK ARAşTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU				
ARAşTIRMANIN AÇIK ADI		Hemofili A ve B Hastalarında Endoglin Ekspresyonu ve Çeşitli Anjiyogenik Faktörlerin Düzeylerinin Değerlendirilmesi		
VARSA ARAşTIRMANIN PROTOKOL KODU				
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Morfoloji Binası 06100 Sıhıye/ANKARA		
	TELEFON	0312 595 82 27		
	FAKS	0312 310 63 70		
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr		
BAşVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAşTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr.Filiz BAKAR ATEş		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAşTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAşTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAşTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
		FAZ 3	☐	
		FAZ 4	☐	
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐	
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐	
		İlaç dışı klinik araştırma	☐	
Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması				
ARAşTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ İmza: 				
Not: Etik kurul başkanı, imzasının vermediği her sayfaya imza atmalıdır.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hemofili A ve B Hastalarında Endoglin Ekspresyonu ve Çeşitli Anjiyogenik Faktörlerin Düzeylerinin Değerlendirilmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER	☐		
KARAR BELGELERİ	Karar No:10-655-18	Tarih:11 Haziran 2018		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, saklanması ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tarı sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULU'N ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOY ADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farankoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.İtlan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Levant YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Şöke ŞENGÖL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.İnci H.HAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Zafer ŞENOCAN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.İtlan ÇAKIR	İç Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Özge GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Selma Koşak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Ali Doğan DURSUN	Fizyoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Güler İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
İlker BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı'nın

Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.