



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE DÜŞÜK
MOLEKÜL AĞIRLIKLIL HEPARİNLERİN
ANJİYOGENEZ ÜZERİNE KISA-ORTA-UZUN
DÖNEM ETKİLERİNİN CİVCİV
KORYOALLANTOİK MEMBRAN YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Turgay ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Mukadder OKUYAN

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BÜYÜME FAKTÖRLERİ VE DÜŞÜK
MOLEKÜL AĞIRLIKLIL HEPARİNLERİN
ANJİYOGENEZ ÜZERİNE KISA-ORTA-UZUN
DÖNEM ETKİLERİNİN CİVCİV
KORYOALLANTOİK MEMBRAN YÖNTEMİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Turgay ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Mukadder OKUYAN

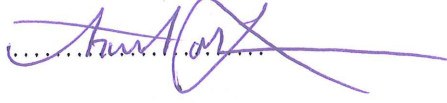
TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tez Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ahmet AYAR

Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı



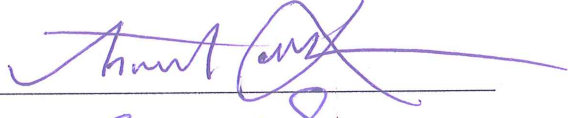
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Turgay Arslan'ın hazırladığı **“Büyüme Faktörleri ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinlerin Anjiyogenez Üzerine Kısa-Orta-Uzun Dönem Etkilerinin Cıvıv Koryoallantoik Membran Yöntemi ile Araştırılması”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Mukadder OKUYAN

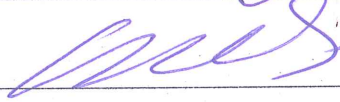


Yüksek Lisans Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ahmet AYAR

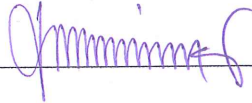


Prof. Dr. Etem ALHAN



Doç. Dr. Şükrücan H. BAYTAN

Doç. Dr. Fatih Mehmet GÖKÇE



Tarih: 27 / 06 / 2016

Bu Tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... Tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09.06.2016

Turgay ARSLAN

İthaf

Yapmış olduğum bu tez çalışmamı, yüksek lisanas eğitimimi tamamlama sürecinde ona yeterince zaman ayıramadığımı düşündüğüm biricik oğlum Deniz Arslan'a ve sevgili eşim Emine Arslan'a ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Fizyoloji yüksek lisans eğitimim boyunca, bana gereğinde bir abla, gereğinde de bir akademisyen gibi davranan, yüksek lisans sürecinin inceliklerini öğreten ve her daim yanımda yer alan sevgili hocam Doç. Dr. Mukadder OKUYAN'a bir ömür minnettar kalarak teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Çalışmamda gerekli malzeme konusunda bölümün olanaklarını esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ahmet AYAR hocama ve yine maddi manevi yönden yardımlarını esirgemeyen bölüm öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet YILDIRIM ve Doç. Dr. Şükrücan H. BAYTAN hocalarıma, bölümde bulunduğum süre zarfında birlikte çalışma fırsatı bulduğum arkadaşlarıma,

Tezimin oluşturulmasında bana yardımcı olan herkese teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, bana her daim yardım eden sevgili eşim Emine Arslan'a ve beni bu günlere dek yetiştiren çok sevdiğim aileme şükranlarımı sunarım.

Turgay ARSLAN

İÇİNDEKİLER

vi

Sayfa

İÇ KAPAK

KABUL ve ONAY

BEYAN

TEŞEKKÜR

İTHAF

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

vi

TABLolar DİZİNİ

viii

ŞEKİLLER DİZİNİ

ix

SİMGELER ve KISALTMALAR

xi

1. ÖZET

1

2. SUMMARY

3

3. GİRİŞ ve AMAÇ

5

4. GENEL BİLGİLER

8

4.1. Anjiyogenez'in Genel Özellikleri

8

4.1.1. Endotelial Hücrelerin Normal Fizyolojideki Fonksiyonları

8

4.1.2. Anjiyogenez Mediatorleri

9

4.2. Epidermal Büyüme Faktörü ve Reseptörleri

11

4.3. Pıhtılaşma Mekanizması

12

4.3.1. Pıhtılaşma Mekanizmasının Dengesi

13

4.4. Doku Faktörü

15

4.5. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü

17

4.5.1. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü ve Malignite

20

4.6. Trombin, Doku Faktörü ve Kanser Anjiyogenezi Mekanizması

23

4.7. Düşük Moleküler Ağırlıklı Heparinler

26

4.8. *In vivo* Anjiyogenez modelleri

30

4.9. Angiogenezi Görüntü Analiz Programları

33

5. GEREÇ ve YÖNTEM

35

5.1. Çalışma Grubu

35

5.2. Malzemeler ve Deneyin Yapılışı

36

5.3. İlaç Hazırlama

38

	vii
5.4. Görüntü Analiz	39
5.5. İstatistiksel Analiz	47
6. BULGULAR	48
7. TARTIŞMA	56
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	59
9. KAYNAKLAR	60
10. ÖZGEÇMİŞ	78



TABLO DİZİNİ

viii

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Antianjiyogenik etkili ultra düşük ağırlıklı heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparinlerin listesi	28
Tablo 2. Agaroza grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	50
Tablo 3. Bevacizumab grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	50
Tablo 4. Bemiparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	50
Tablo 5. Enoksaparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	51
Tablo 6. Setuksimab grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	51
Tablo 7. Tinzaparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	51
Tablo 8. Agaroza grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	53
Tablo 9. Bevacizumab grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	54
Tablo 10. Bemiparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	54
Tablo 11. Enoksaparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	54
Tablo 12. Setuksimab grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	54
Tablo 13. Tinzaparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri	55

ŞEKİL DİZİNİ

ix

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Koagülasyon kaskadı	14
Şekil 2. Doku faktörünün kimyasal yapısı	16
Şekil 3. Doku faktörü yolu inhibitörünün'nin yapısı	18
Şekil 4. Doku faktörü, trombin ve tümör anjiyogenezi mekanizması	24
Şekil 5. Bemiparin'in kimyasal yapısı	28
Şekil 6. Tinzaparin'in kimyasal yapısı	29
Şekil 7. Enoksaparin'in kimyasal yapısı	29
Şekil 8. Angioquant programın genel görünümü	33
Şekil 9. Çalışmanın yapıldığı laboratuvar	34
Şekil 10. 5 cc lik enjektör ile yumurtadan albümin çekilmesi	36
Şekil 11. Yumurtanın küt (sivri olmayan uç) ucundan 2-3 cm'lik delik açılması	36
Şekil 12. Yumurtaların deliklerinin parafilm ile kapatılması ve kuluçka makinesine yerleştirilmesi	37
Şekil 13. 10 µl ve 5 mm çapında şeffaf yapıda oluşturulan pellet	37
Şekil 14. Koryoallantoik membran üzerine pelletin yerleşimi	38
Şekil 15. Analiz için çekilmiş fotoğrafın genel görünümü	40
Şekil 16. Genel görünümlü fotoğrafın pellet'in bir katı alanı olacak şekilde ayarlanması	40
Şekil 17. Angioquant programın fotoğrafın gri tonlu görüntü haline getirme	41
Şekil 18. Angioquant programın fotoğrafın düşük eşik görüntüsü	41
Şekil 19. Angioquant programın fotoğrafın yüksek eşik görüntüsü	41
Şekil 20. Angioquant programına ait fotoğrafın segmentasyon görüntüsü	42
Şekil 21. Angioquant programına ait fotoğrafın iskeletlendirilmesi	42
Şekil 22. Angioquant programına ait fotoğrafın 10 pikselden daha küçük ölçümlerinin budanması	42
Şekil 23. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait orjinal resim örnekleri	43
Şekil 24. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait otomatik analiz resim örnekleri	43
Şekil 25. İmageJ programının örnek bir fotoğraf ile genel görünümü	45

Şekil 26. İmageJ programı ile yapılan damar uzunluk ve kavşak sayımı için orijinal görüntü	45
Şekil 27. İmageJ programı ile yapılan damar uzunluk ve kavşak sayımı örneği	46
Şekil 28. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait manual ölçüm örnekleri	47
Şekil 29. Otomatik ölçüm damar uzunluklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği	48
Şekil 30. Otomatik ölçüm damar kavşaklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği	49
Şekil 31. Manual ölçüm damar kavşaklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayıları grafiği	52
Şekil 32. Manual ölçüm damar kavşaklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayıları grafiği	53

APC	Aktive Protein C
AT	Antitrombin
BM	Temel Membran
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
CAM	Korioallontoik Membran
COX	Siklooksijenaz
DIC	Dissemine İntravasküler Koagülopati
DMAH	Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
ECM	Ekstraselüler Matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
F	Faktör
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FPA	Fibrinopeptid A
FPB	Fibrinopeptid B
FXa	Aktif Faktör X
GDP	Guanozin Difosfat
GTP	Guanozin Trifosfat
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HIF-1	Hipoksi ile İndüklenen Faktör
IGF	İnsilün Benzeri Büyüme Faktörü
İCAM-1	Hücreler Arası Adhezyon Molekülü-1
K	Kunitz
KGF	Keratinosit Büyüme Faktörü
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
M	Molarite
MAPK	Aktive Edilen Protein Kinaz
MMP	Matris Metalloproteinaz

NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NA-DMAH	non-Antikoagulan Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin
NGF	Sinir Büyüme faktörü
NO	Nitrik Oksit
PARs	Proteaz Tarafından Aktive Edilen Reseptörler
PGE2	Prostaglandin E2
PGF	Plesanta Büyüme Faktörü
PKBF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PKEHBF	Platelet Kaynaklı Endotelyal Hücre Büyüme Faktörü
PKC	Protein kinaz C
RBG	Kırmızı Mavi Gri
TAFI	Trombosit Aktive Edebilen Fibroniliz İnhibitörü
TF	Doku Faktörü
TFPI	Doku Faktörü Yolu İnhibitörü
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TM	Trombomodülin
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TSP-1	Trombospondin-1
t-PA	Doku Plazminojen Aktivitörü
t-PAI-1	Doku Plazminojen Aktivitörü İnhibitörü-1
TSH	Tiroid Uyarıcı Hormon
TXA2	Tromboksan A2
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
vWF	von Willabrand Faktörü

1. ÖZET

Büyüme Faktörleri ve Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinlerin Anjiyogenez Üzerine Kısa-Orta-Uzun Dönem Etkilerinin Cıvciv Koryoallantoik Membran Yöntemi ile Araştırılması

Anjiyogenez, daha önce varolanın dışında yeni kapillerin oluşumudur. Anjiyogenezde vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) endotelyal hücrelerin, epidermal büyüme faktörü (EGF) ise epidermal hücrelerin aktivasyonu, migrasyonu ve proliferasyonuna yol açar. Düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH) anjiyogenez büyüme faktörlerini (VEGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve onların inhibitörlerinin sentezini düzenleyerek etki ederler. Cıvciv koryoallantoik membran (CAM) embriyonik koryon ve allantoinden oluşan, ekstraembriyonik bir membrandır. Yumurta fertilizasyonunun dördüncü gününde oluşmaya başlar anjiyogenez ve antianjiyogenez çalışmalarında kullanılmaktadır.

Bu çalışmada DMAH'lerden tinzaparin, enoksaparin ve bemiparin'in anjiyogenik ve antianjiyogenik etkilerinin araştırılmasını amaç edinmiştir ve CAM yöntemi kullanılmıştır. Çalışma altı gruptan oluşmakta ve her grupta yedi fertilize yumurta bulunmaktadır. Kontrol grubu agaroz, VEGF inhibitörü bevacizumab ve EGF inhibitörü setuksimab, DMAH ise bemiparin, enoksaparin ve tinzaparinden oluşmaktadır. Grupların değerlendirmesi, topikal uygulama sonrası 0-12-24-36. saatler olmak üzere kısa, orta, uzun dönemlerde damar uzunluk ve kavşaklarının değişimine bakılmıştır. Damar uzunluk ve kavşaklarının hesaplanması Angioquant ve ImageJ programları ile gerçekleştirilmiştir.

Damar uzunluk değişimi grup karşılaştırmalarında ilaç uygulamasından 12 saat sonra enoksaparin, agaroz $p=0.029$, bemiparine $p=0.035$ ve setuksimaba $p=0.047$ ile anlamlı fark göstermiştir. Agaroz ve ilaç karşılaştırması sonucu 36 saat sonra bevacizumab $p=0.015$, setuksimab $p=0.035$ ve enoksaparin $p=0.002$ ile istatistiki olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. Damar kavşak değişim manuel analizi sonucu enoksaparin ilaç uygulamasından 12 saat sonra $p=0.025$ ve 36 saat sonra $p=0.04$ ile agaroz grubuna oranla anlamlı farklılık göstermiştir.

Bu çalışmanın sonucunda DMAH'lerin antianjiyogenik etkinliğinin olabileceği, antianjiyogenik etkinin molekül ağırlığının büyüklüğü ile bir bağlantı kurulamayacağı,

ayrıca CAM modelinde antianjiyogenik etki ilaç uygulamasından 36 saat sonra daha sağlıklı sonuçlara ulaşılacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bemiparin, Bevacizumab, Enoksaparin, Epidermal büyüme faktörü, Setuksimab, Tinzaparin, Tromboplastin, Vasküler endotelyal büyüme faktörü



2. SUMMARY

An Investigation of the Short-Medium-Long Term Effects of Low Molecular Weight Heparins and Growth Factors on Angiogenesis by Chick Chorioallantoic Membrane Method

Angiogenesis is process that occurs new capillaries from pre-existings. During angiogenesis vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor (EGF) are responsible of activation, migration and proliferation of endothelial and epidermal cells respectively. Low molecular weight heparins (LMWHs) influence angiogenesis growth factor by regulating basic fibroblast growth factor and synthesise of its inhibitors. Chick chorioallantoic membrane (CAM) is extraembryonic membrane that consist of embryonic chorion and allantoic. Chorioallantoic membrane occurs during forth day of fertilization. It is a common method in angiogenesis and antiangiogenesis research. This study claims to investigate antiangiogenic or angiogenic effects of LMWHs tinzaparin, enoxaparin and bemiparin by CAM method.

This study consits of six groups and seven fertilized eggs for each one. We used agarose as control group, bevacizumab as VEGF inhibitor, cetuximab as EGF inhibitor and bemiparin, enoxaparin and tinzaparin as LMWHs. This comparison was made according to vessel lenght and junction changes at immediately after topical application in a time period of (0 hour) short term (12 hours) medium term (24 hours) and long term (36 hours). Calculation of vessel lenght and junctions carried out by automatic measurement with Angioquant software and manual measurement with ImageJ software.

After 12 hours of drug application, vessel length changes were statistically significant in enoxaparin compare to agarose, bemiparin and cetuximab ($p=0.029$, $p=0.035$, $p=0.047$ respectively). After 36 hours of drug application, vessel length changes were statistically significant in bevacuzimab, cetuximab and enoxaparin compare to control group ($p=0.015$, $p=0.035$, $p=0.002$ respectively). In 12th and 36th hours, vessel junction changes were statistically significant in enoxaparin compare to control ($p=0.025$, $p=0.04$ respectively).

The results of this study showed that LMWHs may have antiangiogenic effects and we concluded that antiangiogenic effects of LMWHs do not depends on molecular

weight. In addition, the most effective time for study of antiangiogenic effect is 36 hours after drug application.

Key Words: Bemiparin, Bevacizumab, Cetuximab, Enoxaparin, Epidermal growth factor, Thromboplastin, Tinzaparin, Vascular endothelial growth factor



3. GİRİŞ ve AMAÇ

Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşumu olarak tanımlanmış, endotel hücre aktivasyonu, ekstrasellüler matriksin proteolitik bozulması, endotel hücrelerinin proliferasyonu ve göçü, kapiller damar lümenlerinin oluşumunu içeren çok basamaklı karmaşık olaylar dizini içermektedir (1). Anjiyogenez hayatın her aşamasında hızlı ya da yavaş devam eden bir süreçtir. Embriyogenezde, erişkinlerde yaralanma, cerrahi sonrasında ve bazen de tümör gelişimi ve diyabetik retinopati gibi bazı patolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (2). Anjiyogenez, süreci uyaran ve baskılayan moleküller arasındaki dengeye bağlı olarak kontrol edilir (3). Pozitif etkili proanjiyogenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir.

Civciv koryoallantoik membran (CAM) embriyonik koryon ve allantoinden oluşur. CAM yumurta fertilizasyonunun dördüncü gününde oluşmaya başlar. CAM ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiyogenez hem de antianjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. CAM'ın civciv için fizyolojik önemi, gaz alış-verişinde majör solunum organı olması ve atık ürünler için mesane görevi görmesidir. CAM modeli basit, tekrarlanabilir, ucuz ve anjiyogenik cevabın niceleyici ölçümüne imkan veren bir çalışma modelidir (4, 5).

Kanser hastalarında venöz tromboemboli rastlanma sıklığı antikoagülan ajanlara olan ilgiyi artırmıştır. Antikoagülan tedavinin kanser hastalarında sağkalım üzerine olan olumlu etkisi antikoagülan ilaçlara olan ilginin artmasına neden olmuştur (6). Hiperkoagülabilitenin kanser hastalıklarındaki en önemli etkisi metastaz ve derin ven trombozuna yol açtığı kabul edilmektedir. Bu nedenle son yıllarda yapılan çalışmalarda antitrombotik etkili ajanların kanser tedavisinde bir ufuk olabileceği düşünülmektedir.

Anjiyogenez sürecinde endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) etkinliği bilinen ajanlardır. VEGF, vasküler endotel hücrelerinden salgılır ve anjiyogenez oluşumunu sağlar. Tüp formu oluşumu proliferasyon ile anjiyogenez süresine katılır (7). VEGF inhibitörleri bevacizumab klinikte kanser hücrelerinin anjiyogenezini inhibe etmek için kullanılmaktadır. Beyin tümörleri ve kolorektal kanserlerde özellikle tercih edilmekte ve tedavinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmaktadır (8, 9)

Epidermal büyüme faktör (EGF) insanlarda değişik doku ve hücrelerde yapılabilen polipeptid yapıda mitojenik bir polipeptiddir (10-13). EGF membran yüzeyinde yer alan epidermal büyüme faktörü reseptörleri (EGFR) üzerinden etki eder. EGFR bir transmembran glikoproteini olup reseptör tirozin kinaz ailesindendir (14-18). EGF membran reseptörleri üzerinden hücre proliferasyonu, invazyonu, hücre göçü ve anjiyogenezi üzerinde etkili olur (15, 19, 20). EGF kanser hücrelerinde ve solid tümörlerde ekspresse edilmiştir, EGFR üzerinden fizyolojik olmayan aktivasyonu ile kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve sonunda tümör büyümesi, metastazı, apoptoza direnç ve anjiyogenez ile sonuçlanır. (21, 22). Setuksimab EGFR üzerinden etkili olan bir reseptör antagonisti ajanıdır. Tümör hücrelerinden EGF salınımını inhibe eder ve hücre proliferasyonunu durdurur (23). EGFR üzerinden reseptör aktivasyonunun önlenmesi, internalizasyonu ve salınımın azaltılması olaylarına neden olur (24).

Onkoloji hastalarında yapılan çalışmalarda hiperkoagülasyona ve venöz embolilere sağlıklı insanlara oranla daha sık rastlanmakta ve kanser progresyonuna katkıda bulunmaktadır. Fibrin oluşumu ve plateletler, tümör oluşumu adhezyonu ve anjiyogenezisine katkı sağlamaktadır (25, 26). Antikoagülan etkinlikleri ile onkolojik hastalarda sağkalım üzerine olan olumlu etkileri nedeniyle düşük molekül ağırlıklı heparinler (DMAH) bilim insanlarının ilgi alanına girmesine neden olmuştur. *In vitro* çalışmalarda heparin fragmentleri VEGF reseptörlerine bağlanarak inhibisyon yaptığı rapor edilmiştir (27). CAM yöntemi çalışmalarında heparin ve heparin türevlerinin (DMAH) antianjiyogenik etki yaptığını iddia eden pek çok çalışma bulunmaktadır (28). Antianjiyogenik etkileri olduğu düşünülen ve heparin türevi olan DMAH'ler, antikoagülan etkilerini heparin gibi antitrombin III (AT) ile bağlanarak Faktör IIa ve Faktör Xa'yı inhibe ederek gösterirler. İkincil olarak da doku faktörü yolu inhibitörü (DFYI)'nın salınımını aktive ederek anjiyogenez üzerine baskılayıcı etki gösterdikleri rapor edilmiştir (28).

Bu çalışmaya araştırılmak üzere konu olan DMAH'lerden bemiparin, enoksaparin ve tinzaparinin, anjiyogenez üzerine etkisinin olup olmadığını damarların uzunluk ve kavşak gelişimine olan etkisini irdeleyen ve klinik onaylı antianjiyogenik ajan olan bevacizumab ve antineoplastik ajan setuksimab ile karşılaştırılmış daha önceden yapılmış şimdilik bir çalışma bulunmamaktadır.

Sunulan alışma, DMAH'lerin farklı moleköl ağırlığa sahip olan bemiparin, enoksaparin ve tinzaparinin antianjiyogenik etkinlik üzerindeki rolünü damar uzunluk, kavşak değişimi yönünden VEGF inhibitörü bevacizumab ve EGF inhibitörü setuksimab CAM yöntemi ile karşılaştırarak anjiyogenez üzerine olan etkilerini kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde araştırmayı amaç edinmiştir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Anjiyogenez'in Genel Özellikleri

Anjiyogenez veya daha önce var olan kapillerin dışında yeni damar oluşumu, patolojik süreçlerde ve fizyolojik birçok süreçte anahtar rol oynayan olaylar dizisidir. Kadınlarda menstural döngü, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim gibi normal doku büyümesi, besin, oksijen desteği ve de atık maddelerin uzaklaştırılması yeni damar oluşumuna bağlıdır. Ayrıca ilişkisiz hastalıklar ve birçok farklılık yeni damar oluşumu ile alakalıdır. Bazı patoloji durumlarında örneğin, iskemik dokunun reperfüzyonu sonrası doku hasarı veya anjiyogenezin düşük olduğu kardiyak başarısızlıklarda ve hastalık durumlarını iyileştirmek için anjiyogenezis geliştirilmelidir (29, 30). Birçok hastalıkta ise, fazla anjiyogenez patolojinin bir parçasıdır. Bu hastalıklar kanser (hem solid hemde hematolojik kanser), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz), inflamatuvar hastalıklar (romatoid artritler, Crohn's hastalığı), diabetler (diabetik retinopati), sedef hastalığı, endometriyozis hastalığı ve adiposite (şişmanlık) dir. Bu hastalıklar ise anjiyogenezin inhibe edilmesini içeren tedaviyle fayda görebilirler (31, 32). Anjiyogenezin tedavi açısından ilk tanınması 1970'lerde Dr. Folkman ve Denekamp'ın (tümörün yüksek vaskülerize ve kan desteğine yatkınlığı teorisi) teorisinin ortaya atılması ile olmuştur. Anjiyogenezin, tedavi için hedef olacağı ilk olarak o zamanlar iddia edilmişti. Anjiyostatik bileşiklerin (Anjiyostatin, endostatin, anjiyopoetin 2 vs.) ilk keşfinden (33, 34) hemen sonra 1990'ların başlarında anjiyogenez alanında araştırmalar hızlı bir şekilde genişlemiş ve anjiyogenez inhibisyonun tümör büyümesini azaltabileceği kanıtları giderek artmıştır. Yeni anjiyogenez inhibitörleri preklinik çalışmalarda kanser tedavisi için büyük potansiyel olduğu gösterilmiş ve daha güncel olarak bu bileşiklerin çoğu klinikte kullanılmaya başlanmıştır.

4.1.1. Endotelial Hücrelerin Normal Fizyolojideki Fonksiyonları

Vücuttaki kan damarları uzun yıllardır sadece kanın taşıma bölmesi olarak düşünülmüştür. Günümüzde ise damar düzeni çeşitli yollarla vücudun bütünlüğünü korumada major rol oynayan ve 900 m² den daha geniş vücudun temel organlarından biri olarak kabul görür.

Kan damarları kanla direk temas halindeki endotelial hücreler ve perisitler, düz kas hücreleri, fibroblastlar, temel membran (BM) (35) ve ekstraselüler matriks'in (ECM) yerleştii subendoteliumdan oluşur. Vücuttaki yerleşimine, organ mikro çevresine, hücresel unsurlara, BM'ye, damarın ECM'sine bağı olarak görünüm, yapı ve fonksiyonları farklıdır (36).

Endotelial hücreler dolaşımdaki her tek kan damarında tek katlı tabaka oluşturur ve vücudun birçok düzenleme sürecinde aktif rol alır. Metabolik açıdan küçük çözünen maddeler ve peptitler (proteinler) için aktif ve seçici olmasının yanında kan koagülasyonunu düzenler. Endotel bütünlüğü muhafaza edildiğinde, endotelial hücreler trombomodülün, DFYİ ve doku tipi plazminojen aktivatörü (t-PA) aracılığı ile antikoagülan özellikleri gösterirler. Endotelial hücreler aktivasyonda veya hasarda, trombosit agregasyonunu ve göçünü teşvik eden von Willebrand faktörü (vWF) ve serpin ailesinin bir üyesi olan doku plasminojen aktivatör inhibitörü-1 (t-PAI-1) proteinlerini hızlı bir şekilde serbestler. Ayrıca kan koagülasyonunun ektrensek yolunun başlamasına neden olan doku faktörü (DF) endotelden salınır (37). Endotelial hücrelerin bir diğere önemli özelliğı vücudun belli bölgelerine immün sistem hücrelerini yönlendirebilmeleridir. Esas olarak sitokinle uyarılabilen veya salınabilen hücresel adhezyon molekülleri örneğın, E-selektin ve hücreler arası adhezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve sitokinler, kemo-çekiciler ve kemokinler gibi çözünür faktörler ile iyileşme için enflamatuar bölgelere veya lenfoid organlara bağışıklık hücreleri ile birlikte hareket ederler (38). Sonuç olarak endotelial hücreler yara iyileşmesi, ovülasyon, tümör büyümesi ve diyabetik retinopati gibi damar yeni oluşumuna aktif birşekilde katılırlar. *İn vitro* da olduğı gibi hastalığın ilerleme sürecinde de fonksiyonel olarak analiz etmek zor ve karmaşık olmasına rağmen, güncel veriler ile anjiyogenik kaskaddaki çeşitli adımlarla bu endotelial hücre fonksiyonları arasındaki bağılantı kurulabilir hale gelmiştir.

4.1.2. Anjiyogenez Mediatörleri

Embriyonik gelişim sürecindeki vaskülogenezde yeni endotelial hücreler kök hücreden farklılaşır. Anjiyogenezde ise yeni kan damarları esasen daha önceden varolan damardan ortaya çıkar (39). Yetişkin yaşamında, yara iyileşmesi ve kadınlarda üreme döngüsü sürecinde fizyolojik uyarılar anjiyogeneze neden olur, bu süreçte

vaskülogenez görülmez. Tümör büyümesi, romatoid artrit ve diyabetik retinopati gibi patolojik durumlar normalden fazla anjiyogenez ile karakterizedir. Tümörlerdeki anjiyogenez faz, tümör endotelial hücrelerinin yetişkinlerde normal doku endoteliumundan 20-200 kat daha hızlı çoğaldığı gerçeğini yansıtır (40). Son yıllarda yeni kan damarı oluşumunun moleküler sürecine önemli derece katkı sağlayan pek çok moleküler oyuncu tanımlanmıştır. Vaskülogenez ve anjiyogenez, bir takım mediatörlerin kontrolü altında olan karmaşık süreçlerdir. Bu mediatörlerin bir kısmı aktivatörken, diğerleri inhibitör olarak görev yapmaktadır.

Vasküler endotelial büyüme faktörü, neovaskülarizasyon esnasında en önemli role sahip mediatördür. Vaskülogenezde endotelial öncül hücrelerin göçünden ve farklılaşmasından başlayıp, fonksiyonel damar oluşumuna kadar her basamakta VEGF gereklidir (41-44). Anjiyogenezde ise VEGF, endotelial hücrelerin aktivasyonu, migrasyonu ve proliferasyonuna yol açar. Ayrıca yeni oluşmuş damarların tüp formasyon şeklinin almasında da rolü vardır (27). Fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi, toplam 22 üyeden oluşmaktadır; bunlardan FGF-1 (asidik FGF) ile FGF-2 (bazik FGF) damar oluşumunda ilişkisi vardır. FGF diğer mediatörlerden farklı olarak endotel, damar düz kası, fibroblast gibi damar oluşumu için gerekli tüm hücrelerin farklılaşma ve proliferasyonunu tetikler (45, 46). Epidermal büyüme faktörü (EGF), embriyogenezis, anjiyogenezis, doku ve vasküler sistemlerin onarımında büyük rol oynamaktadır (47). Anjiyogenezde etkili diğer bir mediatör ise Anjiyopoietin'dir. Anjiyopoietin ailesinin dört üyesi vardır: Anjiyopoietin-1, Anjiyopoietin-2, Anjiyopoietin-3 ve Anjiyopoietin-4. Bu mediatörler bir tirozin kinaz reseptörü olan Tie-2'ye bağlanarak fonksiyon gösterirler. Yeni damar oluşumunda özellikle Anjiyopoietin-1 ve Anjiyopoietin-2 önemli rol oynamaktadır. Bu mediatörler vaskülogenez veya anjiyogenez ile oluşmuş damarsal ağın olgunlaşmasını sağlamaktadır. Dokuya taşınan oksijen miktarının yetersizliği sonucu oluşan hipoksi, embriyoda ve erişkinde anjiyogenezin en önemli uyarandır (48, 49). Hipoksi, dokuda hipoksi ile indüklenen faktör1 (HIF-1) sentezlenmesine sebep olmaktadır. HIF-1, başta VEGF ve anjiyopoietin olmak üzere birçok mediatörün salınımını tetiklemektedir (50). Nitrik oksit (NO), anjiyogenezin önemli düzenleyicilerinden birisidir (51). NO, kan akımının yeni gelişen damar duvarlarına uyguladığı mekanik gerime cevap olarak eNOS enzimi etkisiyle sentezlenir (52). Yapılan çalışmalarda endotelden sentezlenen NO'nun damar ağının

şekillenmesinde belirleyici faktör olduğu gösterilmiştir (53). Düşük seviyedeki reaktif oksijen türlerinin yeni damar oluşumu için güçlü bir uyarıcı iken tam tersine yüksek seviyeleri damar oluşumunu ciddi derecede baskılamaktadır (54-56). Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH-oksidad) enzimi, endotel hücrelerinde oluşturulan oksidanların ana kaynağıdır (57). Endotelde oluşan bu reaktif oksijen türleri VEGF ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptör 2 (VEGFR-2) sentezini uyarmaktadır. Embriyonik hücrelerin anjiyogenez oluşturmasında, reaktif oksijen türlerinin destekleyici rolü olduğu vurgulanmaktadır (58). Ancak oksidan seviyesinin çok artması, anjiyogenez önemli derecede baskılar (59). Anjiyogenezde rol oynayan temel prostanoidler; Prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin F2 α (PGF2 α), prostaglandin D2 (PGD2), prostaglandin I2 (PGI2) ve tromboksan A2 (TXA2)'dir.

4.2. Epidermal Büyüme Faktörü ve Reseptörleri

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek fare submandibuler tükürük bezinden izole edilmiştir (60) Cohen, erkek fare submandibuler tükürük bezinde sinir büyüme faktörü (NGF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş sürmesine neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye epidermal büyüme faktörü adını vermiştir (60, 61). EGF birçok memeli türünün değişik doku ve vücut sıvılarında bulunan, 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir. Subkutan yolla enjekte edildiğinde 48 aminoasitli şekle dönüşmekte ve etken hale gelmektedir (10-13). EGF, fare submandibuler tükürük bezinde sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilmektedir. Ancak farelerde submandibular tükürük bezinin çıkarılması sonrasında plazma EGF düzeyinde herhangi bir değişikliğin olmaması EGF'nin organizmada başka bir yerde de sentezlendiğini düşündürmektedir (62, 63). EGF reseptörleri insan vücudunda idrar ve tükürüğe ek olarak mide, pankreas sıvısı, serebrospinal sıvı, seminal sıvı, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. EGF ayrıca birçok dokuda, özellikle karaciğer ve plasenta hücrelerinde bulunmakta ve epitelyal ve mezotelyal kökenli hücrelerde mitojenik özelliğe sahiptir (11, 64). Pek çok hücre kültürü ortamında tanımlanan EGF reseptörleri epidermal dışı orijinli olabilmekte ve hücreye etkisini ise reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirmektedir (11, 12, 62). Reseptörler fibroblastlarda, kornea ve lenste, ince bağırsak epitelinde, glia hücrelerinde,

epitelyal karsinoma hücrelerinde gösterilmiştir (11, 12, 62). Pek çok mezodermal ve ektodermal hücre için EGF mitojenik özelliktedir.

Tümör hücrelerinin proliferasyonunda büyüme faktörlerinin reseptörleri aktive etmesi önemli bir basamaktır. Epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) inhibitörleri, metastaz yapmış epitelyal kanserlerin tedavisinde geliştirilmiş etkinliği yüksek ajanlardır (14, 15). Epidermal büyüme faktör reseptörü, erbB hücre reseptör ailesindendir. EGFR'leri, erbB ya da tirozin kinaz'lar olarak da bilinir. erbB protein ailesi, yapısal olarak ilişkili dört transmembran reseptörden oluşur. Bunlar: EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (Her2/ neu), ErbB3 (HER3), ve erbB4 (HER4) (14-18). Epidermal büyüme faktörü reseptörü 170 kd'luk bir transmembranöz glikoprotein olup tip 1 reseptör tirozin kinaz ailesindendir. EGFR'nün fizyolojik olmayan aktivasyonu ise kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ve sonunda tümör büyümesi, göçü, stromal invazyon, apoptoza direnç ve anjiogenez ile sonuçlanır (15, 19, 20). Setuksimab ve panitumumab EGFR hedefli ilaçlardan (15, 17, 18, 65, 66) EGFR'e yönelik monoklonal antikorlardandır.

4.3. Pıhtılaşma Mekanizması

Oxford'lu araştırmacılar tarafından 1955 yılında, trombin oluşumunun iki ayrı yol teorisi geliştirilmiştir ve birincisi ekstrinsek yol olup DF bağımlıdır diğer yol ise, intrinsek yoldur ve DF bağımsızdır (67). Bu teoriye göre ekstrinsek yol basit bir reaksiyon olup, Ca^{++} iyonları varlığında, FVII'nin, DF ile etkileşime girerek, FX'u aktif formuna dönüştürmesi ile karakterizedir. İntrinsek sistem ise daha karmaşıktır ve 1964 yılında tanımlanmış olup beşli yükseltgenme reaksiyonları zincirinden oluşur. Bu zincirde enzimin aktive ettiği substrat bir sonraki substrat için aktif enzim olarak rol oynar. Doku yüzeyin aktiflediği FXII, FXI'i aktive eder, FXIa ise FIX'u aktive eder, daha sonra FIXa, FVIII'i aktifler. Son olarak da FVIIIa, FX'u aktif formuna dönüştürür (68, 69). Koagülasyon kaskadı, endotel hasarı veya aktivasyonu ile kan akımına subendotelyal doku faktörünün sentez ve salınımı ile başlar ve koagülasyon üç fazda oluşur; başlangıç, üretim ve terminasyon fazıdır (70) ve Şekil 1'de sunulmuştur.

Baslangıç fazı: Az miktarda trombin meydana gelmesi ile karakterize olan bu faz, düşük hızda gerçekleşir ve trombositlerin kısmen aktivasyonu ve FV ve FVIII prokoagülanların proteolizi ile meydana gelir (71). Bu faz DF salgılayan hücrelerin

FVII/FVIIa kompleksi ile karşılaşması ile başlar. FVIIa kofaktörü olan DF yokluğunda substratları olan FIX ve FX üzerinde oldukça zayıf etki gösterir. DF'nin FVII'ye bağlanması ile hızla aktif formu olan FVIIa'ya dönüşür. Oluşan DF/FVIIa kompleksi FIX ve X'u aktif formları olan FIXa ve FXa'ya dönüştürür. FXa ve FVa trombin oluşumuna yol açar. Başlangıçta eser miktarda üretime ilave olarak FV ve FVIII faktörlerinin aktifleşmesi ile daha fazla trombin üretilir.

Üretim fazı: Trombin üretiminin meydana geldiği fazdır. Bu fazın karakteristiği yüksek hızda protrombin dönüşümü ve fibrin pıhtısı oluşmasını sağlayan bu kofaktörlerin geri aktivasyonudur. Büyük, 300 kilodalton (kDa) ağırlığında, nonproteolitik, multi dominan bir protein olan FVIIIa, fosfolipid yüzeyde maksimum üretimi sağlamak için enzim FIXa, substrat FXa kompleksinin oluşumunu sağlar. FXa aynı zamanda fosfolipid yüzeylerde bulunan etkili üretim için protrombin'i düzenleyen FVa ile de bir kompleks oluşturur.

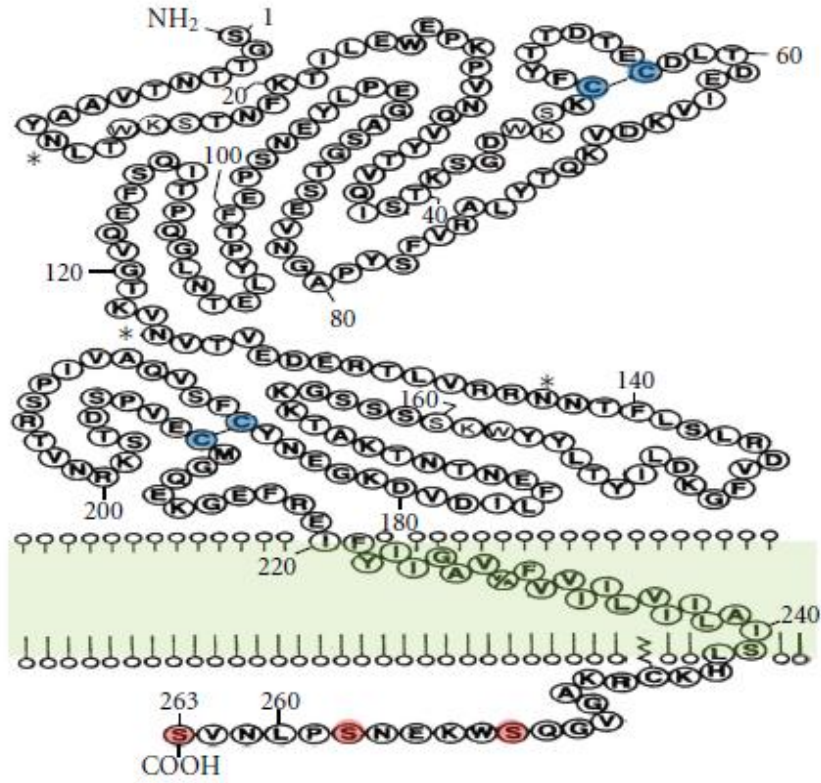
Son olarak terminasyon fazında trombin üretimi protein C ve DFYİ yoluyla sonlandırılır ve aktif haldeki serin proteazlar antitrombin III tarafından inhibe edilir (72).

fibrinolizi engeller. Trombin-TM kompleksi iki amaca hizmet eder; negatif feed back etki ile fibrin ve trombin yığılmasını engeller ve plazmin aktivasyonunu inhibe eden, pıhtı lizisini geri döndüren TAFI'yı aktive ederek fibrin birikimini engeller. FIXa-FVIIIa kompleksi, FVIIIa'nın inaktivasyonu ile regüle olan bir sistemdir ve bu regülasyon FIXa, FXa, trombin veya APC tarafından proteolitik ayrılma ile gerçekleşir. FIXa direkt olarak antitrombin (AT) tarafından inhibe edilir.

FXa-FVa kompleksinin aktivitesinin düzenlenmesi, FVa'nın APC ile inaktivasyonu ve FXa'nın AT tarafından inhibisyonu yolu ile olur. Trombin, heparin varlığında AT tarafından inaktive edilir. AT'nin fonksiyonel yetmezliği venöz tromboz gelişimi riskindeki artış ile ilişkilidir (76). AT, FIXa ve FXa gibi aktif koagülasyon proteazlarının tamamını temizleyen önemli bir faktördür. FVIIa, AT tarafından inhibe edilmemesine rağmen, DF'ne bağlı halde iken heparin varlığında AT tarafından inhibisyonu 33 kat artar. Bu artış AT'nin, DF-FVIIa kompleksini inhibe etmede önemli bir faktör olduğunu gösterir. Bununla birlikte fizyolojik AT konsantrasyonları ile yapılan çalışmalarda AT'nin reaksiyonun başlangıç aşamasında hiçbir rolü olmadığını göstermiştir (77).

4.4. Doku Faktörü

Doku faktörü aynı zamanda Tissue Faktör, Tromboplastin ve CD 142 olarak da bilinir. DF 47 kDa ağırlığında bir transmembran hücre yüzey glikoproteinidir ve *in vivo* koagülasyon sisteminin temel başlatıcısıdır (78). DF'nin kimyasal yapısı Şekil 2'de sunulmuştur.



Şekil 2. Doku faktörünün kimyasal yapısı (79)

Koagülasyonun başlangıç fazı prokoagülan DF'nin, kanda eser miktarda bulunan FVIIa ile karşılaşması ile meydana gelir. Endotel hasarı, sistemik (endotoksemi ve sepsis) ve lokal proinflamasyon durumlarında DF'nin damara salınması ile başlar (80). FVIIa-DF kompleksi, FIX ve FX'un aktif formlara dönüşmesini sağlar. FIXa ve FXa ise trombin üretimi ve fibrin formasyonuna yol açar.

Doku faktörü, vaskülarize dokulardan, plasenta, beyin, kalp ve akciğer gibi ekstravasküler alanlardan salınır. Damar duvarındaki DF predominant olarak adventisya ve media tabakasında lokalizedir. Damar duvarı çevresindeki birçok hücre tipi, adventisyal fibroblastlar, düz kas hücreleri, keratinositler, astroglia, kalpteki miyosit hücreleri DF salınımı yapar (81, 82). Bu hücre, spesifik DF salınımı ve dolaşım sisteminin bütünlüğü bozulduğunda koagülasyon sistemini aktive etmeye hazır şekilde koruyucu prokoagülan özellik gösterir. Böylece endotel bariyeri bozulduğunda veya aktive monosit yüzeyinde DF salınımı olduğunda kana DF geçisi olur. Ancak sağlıklı kişilerde de tam kanda DF aktivitesi vardır (83). DF, endotelium ve monositlerden *in vitro* koşullarda endotoksin, sitokinler ve forbol esterleri tarafından (bu hücreler DF salınımını yapmasalarda) indüklenebilirler (84, 85). *In vivo* şartlarda DF salınımının indüklenmesi, endotel ve monosit aktivasyonu sırasında bir seri değişikliğin bir parçası

olarak gelişir ve ateroskleroz (86), dissemine intravasküler koagülopati (DIC), malignite (87) ve ksenograftların hiper akut rejeksiyonu gibi trombozisin birçok patogenezinin dahil olur (88). DF'nin ateromatöz plaklardaki makrofajlardan güçlü salınımı, miyokard infarktüsünü takiben gelişen plak rüptürü ile kana karıştığı zaman patolojik intravasküler trombozise neden olur (88).

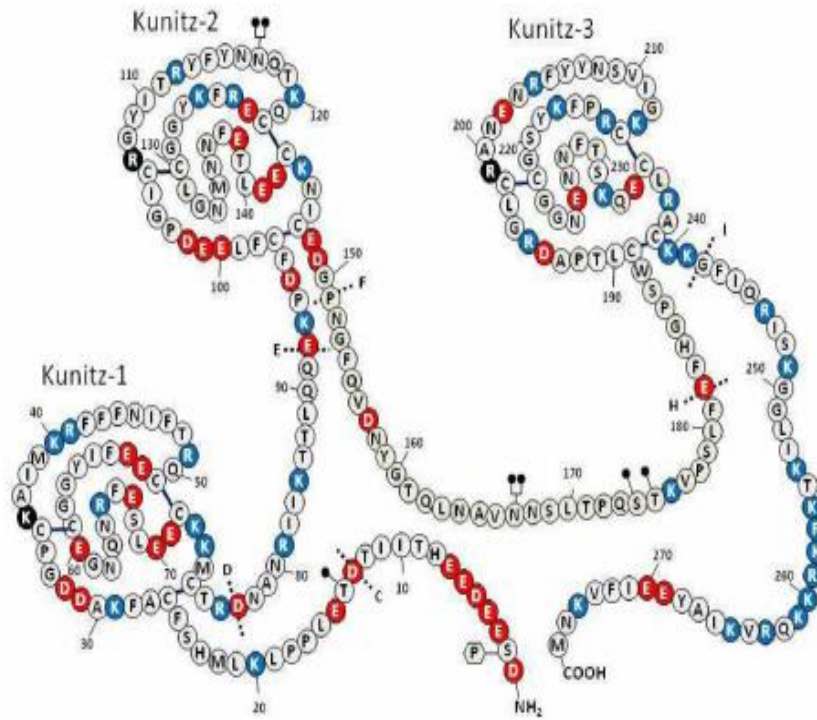
Vasküler inflammatuar hücrelerde olduğu gibi peritümör inflammatuar makrofaj ve fibroblastlarda DF salınımı, ekstrasvasküler tümör fibrin birikimiyle alakalıdır. Endotelial hücre aktivasyonu, trombomodülin ve heparan sülfatın normalde AT ve DFYİ'nin de dahil olduğu proteoglikanlar tarafından tutulan birçok antikoagülan molekülün, hücre yüzeyinden kaybıyla hızlı salınımlarını izleyen bir olaydır. DF, birçok dokuda anormal durumlarda inflammatuar cevap modülatörü olarak görev yapmaktadır (89). DF'nin patolojik salınımı, makrofaj derivesi köpük hücreleri, aterosklerotik hücrelerdeki düz kas hücreleri, kanser hücreleri, septik durumlarda monosit hücreleri nadir olarak da damar düz kas hücreleri ve yanındaki mezenkimal hücrelerde görülür (90). DF başlıca normal damarlarda adventisyada yerleşmiş olup, damar hasarı ile salınmaya başlar. DF salınımı gram negatif sepsis, ateroskleroz ve kanser gibi değişik patolojik durumlarda indüklenir ve ölümcül fibrin depolanması ve tromboza yol açar (91). Normal plazmada koagülasyon faktörlerini nötralize eden doğal inhibitörler vardır. Bunların başlıcaları DFYİ, protein C, protein S, antitrombin III'dür.

4.5. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü

Doku faktörü ilişkili koagülasyonu inhibe eden endojen inhibitör, 40 yıldan fazladır deneylerle gösterilmiştir, ancak son 10-15 yıldır biyolojisi hakkında bilgi edinilmesi ve üretilmesi yeniden ilgi alanına girmesine neden olmuştur. Kalifornia Üniversitesi Samuel Rapaport Laboratuvarında Sanders ve arkadaşları tarafından 1985 yılında DF/FVIIa katalitik kompleksini FX varlığında inhibe eden plazma lipoprotein fraksiyonu içeriği rapor edilmiştir (92). Bu araştırma sonucu daha sonraki yıllarda DFYİ olarak adlandırılan inhibitörle ilgili yeni araştırmaların yapılmasının başlatılmasına neden olmuştur.

Doku faktörü yolu inhibitörünün yapısı, peptid segmentler ile çevrili üç Kunitz tip alandan oluşan modüler bir proteindir. Birbiri sıra tekrarlayan elementler; birinci Kunitz alanı (K1) tarafından takip edilen N-terminal asit bölgeler, bir bağlayıcı bölge, ikinci bir

Kunitz alanı (K2), ikinci bir bağlayıcı bölge; üçüncü Kunitz alanı (K3) ve C terminal temel alan şeklindedir (Şekil 3). K1 alanı FVIIa'nın DF ile kompleks oluşturmasını ve K2 alanı FXa'yı inhibe eder. K3 için ise direkt bir proteaz inhibisyon fonksiyonunun olduğu gösterilmemiştir. Ancak DFYİ'nin C terminal bölgesi koagülasyonun hızlı fizyolojik inhibisyonu için gerekli olduğu ve düz kas hücre proliferasyonunun inhibisyonunda rol aldığı ve ek olarak C terminal bölgenin DFYİ'nin hücre yüzeyine bağlanmasında önemli rollere sahip olduğu araştırmalarla vurgulanmaktadır (93).



Şekil 3. Doku faktörü yolu inhibitörünün yapısı (94).

Doku faktörü yolu inhibitörü, FXa'yı direkt inhibe eder ve FXa bağımlı FVIIa-DF katalitik kompleks oluşumunun feedback (geri-bildirim) inhibisyonunu düzenler (95). FVIIa-DF kompleksi, koagülasyon başlangıcından sorumludur, DFYİ aracılı geribildirim inhibisyon teorisine göre; kalıcı hemostaz için FVIII-FIX ve FXI'in güçlendirilmiş prokoagülan etkileri için gereklidir (96). DFYİ, FVIIa'ya FXa'dan daha yavaş bağlanır, FXa-DFYİ kompleksi FVIIa-DF'nin güçlü bir inhibitörüdür. Bu etkileşimler sonucu dörtlü bir inhibitör kompleks olan FXa-DFYİ-FVIIa-DF formasyonu gelişir. Bu bilgiler DFYİ'nin mekanizmasını iki basamak olarak gösterir; 1. Basamakta; DFYİ, FXa'ya bağlanır, FXa-DFYİ kompleksi, FVIIa-DF kompleksine bağlanarak aktivitesini tamamen bloke eder (97). DFYİ'nin plazma konsantrasyonları

düşüktür, ancak kanda dolaşan DFYİ'nin bir kısmı LDL, HDL, lipoprotein (a) gibi lipoproteinlere bağlı bulunur (98, 99). Plazmadaki predominant DFYİ formu 34-41 kDa ağırlığındadır, DFYİ kanda farklı ağırlıkta heterojenite gösteren formları bulunur. Daha az bulunan formları yüksek moleküler ağırlığa sahiptir (104). Büyüklüğündeki bu heterojenite, kısmen, DFYİ ve Apo AII arasındaki karışık disülfid komplekslerinin oluşumunun bir sonucu olabilir (100). DFYİ'nin major formu LDL'ye bağlı olup 34 kDa ağırlığında moleküler ağırlığa sahiptir, tam uzunluğa sahip DFYİ'nin distal kısmından yoksundur ve K3 tipin çoğunluğunu oluşturur. 41 kDa formu, HDL ile dolaşır ve DFYİ'nin karboksi terminal köklü formuna benzer ve K3 alanında, apoprotein AII ile disülfid bağlı sisteinli bir kalıntı içerir (101).

Doku faktörü yolu inhibitörünün lipoproteinlerle ilişki mekanizması henüz bilinmemektedir. Plazma DFYİ'nin geniş karboksi terminal kökü lipoproteinlere bağlı bulunur ve tam uzunlukdaki DFYİ'nin lipoproteinler ile bağı *in vitro* olarak yüksek sodyum klorür konsantrasyonlarında geri döndürülebilmiş olması iyonik bir etkileşimin göstergesidir. Zıt olarak, endojen DFYİ'nin plazma lipoproteinlerine bağlanması sadece üre, deterjan gibi denatüre edici ajanlar ile geri döndürülebilir ve hidrofobik bir etkileşimin göstergesi kabul edilir (102). Miks disülfid kompleks, DFYİ'nin karboksi terminal kökünün 3 Kunitz alanı ve apolipoprotein AII arasında yerleşmiştir ve DFYİ'nin HDL'ye bağlanmasında rol alır. Fakat non-apoprotein AII bağları ve lipoproteinlere bağlı plazma DFYİ formlarının etkileşimlerini açıklamaz (79).

Doku faktörü yolu inhibitörü seviyelerinin sağlıklı bireylerdeki değeri 0.7-1.4 Ü/ml.'dir (103). Normal fizyolojik koşullarda DFYİ'nin ana sentez yeri damar endotelidir (104). Normal insan dokularının immünohistokimyasal analizlerinde DFYİ, mikrovasküler endotel ve megakaryositlerde de tespit edilmiştir. Farklı organ endotellerindeki DFYİ gen ekspresyonu olasılıkla organın fizyolojik durumuna göre değişmektedir (105). En yüksek DFYİ mRNA'sı insan akciğer ve kalbinde saptanmış olup (105), bu bulgu fare deneyleri ile de desteklenmiştir (106). Bunların dışında az miktarda DFYİ monosit, makrofaj, akciğer fibroblastları, vasküler düz kas hücreleri, larengeal skuamöz epitel hücreleri, astrositler, mezotel hücreleri, mezenkimal hücreler tarafından da sentezlenir (93). İnsan fetusunda DFYİ, endotel ve karaciğer dışında akciğer, böbrek ve barsak epitelinde de sentezlenir. Ayrıca DFYİ plasentada

sitotrofoblastlar ve sinsityotrofoblastlar tarafından fazla miktarlarda sentezlenir ve plasental kan akımının devamlılığını sağlamada önemli olduğuna inanılmaktadır (107).

Doku faktörü yolu inhibitörünün salınımı pekçok hücre tipinde değişik inflamatuvar uyarana yanıt olarak düzenlenir. Normal kültür koşullarında vasküler endotel hücreleri tarafından DFYİ sentezlenir. Hücrelerin serum ile uyarılması durumunda DFYİ sentezinde hafifçe artış olmaktadır (108). Kısa bir stres uygulanması halinde, insan endotel hücrelerinde, DFYİ sekresyonunda iki kat artış tespit edilmiştir (109). Ek olarak trombin, vasküler endotelden hücrel DFYİ salınımını artırır, plazma ve eş zamanlı epitelial hücre yüzeyinde DFYİ düzeylerinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (108).

Doku faktörü yolu inhibitörü organizmada üç havuzda dağılır; %80-85'i endotel hücre yüzeyi ile ilişkilidir, %10'u dolaşımda lipoproteinlere bağlı ve az miktarda serbest olarak bulunur ve %3'ü trombositlerde bulunur (109). Endotel glikozaminoglikanlara bağlı olan formu en güçlü antikoagülan özelliğe sahiptir.

İntravenöz heparin uygulaması sonrası endotele bağlı DFYİ salınımı olur ve plazma DFYİ konsantrasyonu iki-dört kat artar. Bu gözlem heparinin DFYİ'nin konsantrasyonunda yaptığı artış antikoagülan etkisini açıklamaktadır (110). DFYİ düzeyleri gebelik ve doğumun erken evresinde artar ve yenidoğanda, erişkinden daha düşük düzeydedir. Normal siklik hormonal durum DFYİ düzeylerini etkilemez, bununla birlikte oral kontraseptif kullanan kadınların bir kısmında (%25'i) düşük seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir (111) ve diğer koagülasyon inhibitörleri ile kıyaslandığında, yüksek düzeyleri yaşlılarda subklinik kardiyovasküler hastalıkla ilişkili olup, endotel hasarının iyi bir göstergesidir (112).

4.5.1. Doku Faktörü Yolu İnhibitörü ve Malignite

Koagülasyon bozuklukları maligniteye bağlı ölümlerin en sık sebeplerinden biridir. Kan koagülasyon aktivasyon sistemi ile malignite arasındaki ilişki 1865'lere dayanmaktadır. Prof. Armand Trousseau, bugün hiperkoagülopati olarak adlandırılan, kanserle klinik venöz tromboembolizm gelişiminin korelasyonuna değinmiştir (113). Trousseau sendromu, malignitelerde tekrarlayan tromboembolik epizodlar ve kronik düşük dereceli intravasküler koagülasyon olarak bilinen bir komplikasyondur (114, 115). Trousseau sendromunun kökenini, dolaşımda tümör hücre DF'nin sürekli

bulunmasına dayandıran iddialar mevcuttur (116, 117). Hiperkoagülasyon, kanser hastalarında iki önemli klinik duruma sebebiyet verir; bunlar venöz tromboembolizm ve metastazdır.

Venöz tromboembolizm; tromboz, malignitenin sık görülen bir komplikasyonu olup kanser ölümlerinin ikinci önemli nedenidir. Kanser hastalarındaki tromboembolizm sıklığı, kanserin tipine ve kanser tedavi türü gibi diğer risk faktörlerine göre değişir (118). Birçok patogenetik mekanizma malignitelere pıhtılaşma aktivasyonunu başlatabilir. Genel faktörler; paraprotein üretimi, inflamatuvar reaksiyon, nekroz ve hemodinamik bozukluklar gibi akut faz cevabı iken, spesifik faktörler; tümör veya konak hücrenin prokoagülan özelliği olarak belirtilebilir (119).

Metastaz; hemostatik faktörler ve malignite arasındaki bağlantıyı gösterebilecek ilk ipuçları, mevcut hemostatik faktörleri ve tümör hücrelerinin ko-lokalizasyonlarını *in vivo* olarak gösteren çalışmalardan gelmiştir (120). Malign hücreler, DF, FXa'yı direkt aktive eden sistein proteaz gibi prokoagülanları salgılar. Tümör hücreleri, monosit-makrofaj ve endotel hücreleri gibi konakçı hücrelerden DF salınımını arttırmırlar. Bu, tümör etrafında fibrin formasyonunu meydana getirebilir. Fibrinin, çoğu tümörde, stromanın önemli bir komponenti olduğu gösterilmiştir. Sıklıkla yara zemininde gözlenen tümör stromasının anjiyogenezis ve inflamatuvar infiltratlar gibi diğer özellikleri tümör stromasının erken dönem yara stromasıyla karşılaştırılabileceğini gösterir (121). Yara iyileşmesine analog olarak tümör stromasındaki ilk fibrin birikimi zamanla yerini daha matür, kollajen içeren bağ dokusuna bırakır (122, 123). Fakat yapılan çalışmalarda tümör büyümesinde fibrinin görevinin anlaşılmasını sağlayacak bir mekanizma şimdilik anlaşılamamıştır. Fibrinin tümör stroması gelişiminde, yara stroması oluşumundaki görevine analog bir işlevi varsa, bu fibrinin tümör stroması gelişiminde, hücre adezyonunu sağlamaktan daha ileri işlevlerinin olabileceğini düşündürmektedir. *In vitro* çalışmalar, üretilen endotel hücrelerinin fibrinojene adhere olduklarını ve daha yüksek fibrinojen konsantrasyonlarına sahip matrikslere göç ettikleri göstermiştir. Tümör stromasındaki fibrin, malign hücrelerin gelişimini sağlayabilecek anjiyogenezise yardımcı olabilir. Fakat fibrinojen ve plazminojenden yoksun farelerde yapılan son çalışmalar, ne fibrinin ne de plazmine bağımlı fibrinin düşüşünün yara zemininde erken anjiyogenezis ve granülasyon dokusu oluşumunda

gerekli olmadıklarını göstermiştir (124). Bu nedenle, bu faktörlerin tümör stroması oluşumundaki olası kritik rolü hala bilinmemektedir.

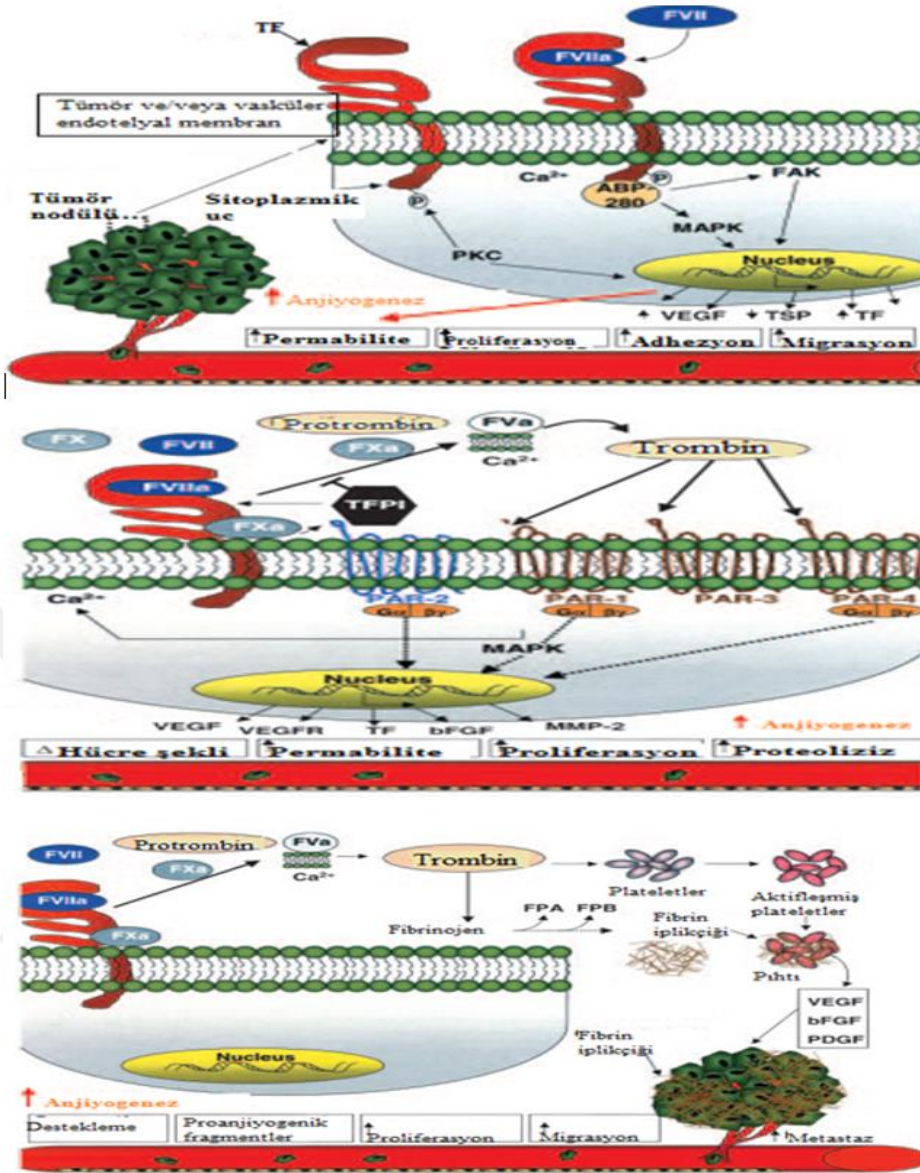
Tümör-konakçı etkileşiminde pıhtı aktivasyonunun esas uyarıcısı DF'dir. DF, malign fenotiple ilişkili olup anjiyogenezin başlangıcında bir belirleyicidir. Bu hiperkoagülabilité durumuna rağmen DFYİ düzeyleri solid tümörlü hastalarda artmış bulunmaktadır (125). DFYİ'nin yüksek plazma düzeyleri, başlıca fulminan DIC ve sepsis hastalıkları durumunda rapor edilmiştir, ancak ileri evre kolon ve pankreas kanserli hastalarda da yüksek DFYİ düzeyleri tesbit edilmiştir. DFYİ malign hastalıkların ilerlemesi ile ilişkili olarak artar, fakat diğer koagülasyon inhibitörleri malign hastalığın ilerlemesi ile azalma gösterir (126, 127). Amirkhosravi ve arkadaşları, B16 melanomunda deneysel olarak DFYİ'nin akciğer metastazını inhibe edici etkisini rapor etmişlerdir. DFYİ çalışması, iki temele dayandırılıyordu. Direkt olarak; B16 melanom hücreleri DFYİ salgılayan taşıyıcıyla enfekte edilip farelere enjekte edilmiş ve indirekt olarak; tümör enjeksiyonundan önce rekombinant DFYİ veya DFYİ geni enjekte edilmiş, bütün olgularda metastaz yaklaşık %80 oranında azalma gösterdiği bildirilmiştir. Hem serbest dolaşan hem de tümör hücresi ile ilişkili DFYİ hematojen metastazda önemli bir rol oynayabileceği fikrini desteklemektedir (128). Tümör enjeksiyonundan hemen önce rekombinant DFYİ uygulanması hem tümör hücrelerinin neden olduğu akut trombositopeniyi hem de uzun vadede akciğer metastazını azaltır (128). Pıhtılaşma sistem aktivasyonunun, deneysel metastazı arttırıcı yönündeki yeni bulguları, DF yolunun aynı zamanda anjiyogenez üzerinde etkisi olduğunu göstermiştir. Elde edilen veriler DFYİ düzey artışının primer tümör büyümesini değiştirmediğini ve böylece de anjiyogenez blokajında DFYİ aktivitesinin esas role sahip olmadığı tartışmasının başlamasına neden olmuştur (119). Bu bulgular tümörün cerrahi olarak çıkarılmasını takiben yayılması gibi akut durumlarda, rekombinant DFYİ'nin anti-metastatik bir ajan olarak kullanılabileceğini fikrini destekler sonuçlarına ulaşılmıştır (128).

Doku faktörü yolu inhibitörü düzeylerinin yüksek konsantrasyonda bulunması, hastanın biyolojisinden çok koagülasyon aktivitesinin derecesiyle ilişkilidir. Karsinom hücreleri çevre dokuyu istila ederek metastaz yaparlar. Fibrin formasyonu tümör invazyonuna karşı bir savunma mekanizması olarak düşünülmektedir çünkü kanser hücreleri DFYİ üretimini arttırarak konaktaki koagülasyonu inhibe eder. Endotel

hücrelerinden DFYİ üretimi kanser hücrelerinin kendisi, aktif monositler veya stroma hücrelerinden salınan sitokinler tarafından uyarılabilir. Karsinom hücreleri tarafından üretilen tümör nekroz faktör (TNF) alfa ve interlökin 1'in DFYİ sentezini uyardığına dair çalışmalar mevcuttur (129). Solid tümörlü hastalarda yüksek DFYİ düzeyleri, muhtemelen fibrin formasyonunu azaltır ancak patogenetik mekanizma şimdilik bilinmemektedir.

4.6. Trombin, Doku Faktörü ve Kanser Anjiyogenezi Mekanizması

Tümör anjiyogenezi ve pıhtılaşma sistemi arasındaki olası bağlantı pıhtılaşma bağımlı ve pıhtılaşma bağımsız olmak üzere gerçekleştiği ileri sürülmektedir (130). Tümör anjiyogenezi-koagülasyon sistemi elamanları arasındaki bağlantı Şekil 4'de sunulmuştur.



Şekil 4. Doku faktörü, trombin ve tümör anjiyogenezi mekanizması (131).

Şekil 4'in üst kısmına bakıldığında pıhtılaşma bağımsız mekanizma görülmektedir ve buna göre; DF, anjiyogenezi trombin ve fibrin oluşumundan bağımsız bir şekilde tetikler. Bu mekanizmalar vasküler endotelial hücreleri ve pek çok tümör hücrelerinde aşırı DF ve bileşenlerin aracılık ettiği mekanizmalardır. DF reseptörünün sitoplazmik ucundaki serin kısmı ligand kapılıdan bağımsız protein kinaz C (PKC) tarafından fosforillenir. Reseptörün fosforilasyonu farklı genlerin transkripsiyonel aktivasyonu veya inaktivasyonu ile sonuçlanan sinyalleşme gerilemesini başlatır. DF aktivasyonu ile bir antianjiyogenik faktör olan trombospondin-1 (TSP-1) üretimi azaltılırken bir proanjiyogenik faktör olan VEGF üretimi artırılır. VEGF, DF üretimini

artırarak sırasıyla tümör büyümesi ve pıhtı oluşumu kısır döngüsünü devam ettirir. VEGF ayrıca tümör ve vasküler endotelial hücrelerinin etrafında fibrince zengin proanjiyogenik matris birikimine ve plazma protein sızıntısına sebep olan vasküler geçirgenliği artırır. Artmış VEGF ve azalmış trombospondin-1 tümör anjiyogenezinin artmasına katkıda bulunan endotelial hücrelerin proliferasyonunu tetikler. FVII'nin DF ile ligand bağ oluşturmaları FVII'nin aktifleşmesine ve hücre içi Ca^{++} artışına yol açar. Hücre içi Ca^{++} artışı sırayla protein kinaz C'yi (PKC) aktifleştirir ve DF reseptörünün sitoplazmik ucunun fosforilleşmesine neden olur. Ayrıca ligand baği aktin filamentlerinin hareketine neden olan sitoplazmik uçtaki Aktin bağlayan protein 280'nin (APC-280) bağlanmasını kolaylaştırır. Bu bağlantı mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyalleşmesini ve fokal adezyon kinaz (FAK)'ın fosforilleşmesini ve tümör anjiyogenezi için temel olan endotel hücre adhezyon ve göçü artışını sağlayan sinyalleşme gerilemesini düzenler.

Anjiyogenez mekanizması sunulmuştur Şekil 4'in orta kısmında pıhtılaşma bağımlı trombin ve buna göre; DF pıhtı oluşumu ve fibrin den bağımsız trombin oluşumu aracılı anjiyogenezi tetikleyebilir. DF reseptörünün aktivasyonu FVII ile ligand baği aracılığı ile olur. Aktif FVII ve DF-FVIIa kompleksi FX'u aktifleştirir. Eğer DFYİ, DF-FVIIa-FXa kompleksine bağlanmaz ve üçlüyü inaktive etmez ise FXa kompleksten ayrılır başka bir fosfolipid membranda Ca^{++} ve FVa varlığında proteolitik olarak protrombinin trombine dönüşümü olan protrombinaz oluşum kopleksi ile ilişkiye geçer. DF hücre membranına baği proteaz tarafından aktive edilen reseptörleri (PARs) bağlayarak pıhtılaşma bağımsız anjiyogenezi tetikleyebilir. PARs'ların N-terminal bölgesinin trombin tarafından kapatılması, baği bir ligand olarak görev yapan yeni N-terminal bölgesi ortaya çıkarır. Bu baği ligand molekül içi yedi transmembran G protein çifti reseptörünün ikinci transmembran bölgesini bağlar. Trombin PAR-1, PAR-3 ve PAR-4'e yapışır fakat PAR-2ye yapışmaz. Tripsin, triptaz, DF-FVIIa kompleksi veya FXa gibi diğer proteazlar PAR-2'yi aktifleştirebilirler. PARs'ların aktivasyonu G proteini ile ilgili GDP'dan GTP'a değişimi ile sonuçlanan yapısal değişikliklere neden olur. G proteinleri nükleotid bağlanma bölgesi ve a alt tiplerini içeren α , β ve γ heterodimerlerinden oluşur. Çeşitli G proteini alt türlerinin dokuya özel stimülasyonu trombine farklı yanıtlar verir. Özel sinyal transdüksiyon kaskadı PARs'lara baği G proteinin alt türlerine baği olarak PARs'ların aktivasyonu ile başlar. Birçok genin

transkripsiyonel aktivasyonuna neden olabilen MAPKs gibi sinyal transdüksiyon basamakları anjiyogeneze katılır. PARs'ların trombin ile aktivasyonu VEGF, VEGF reseptörleri, DF, bFGF ve matris metalloproteinazlar (MMP-2) anjiyogenez ile ilişkili birçok genin aktivasyon artışına neden olur. Bu genler, tümör anjiyogenezinin artışına sebep olan endotelial hücre şekli değişikliği, artmış vasküler geçirgenlik, artmış endotelial hücre proliferasyonu ve artmış proteoliz gibi birçok pleiotropik cevaplara neden olur.

Fibrin mekanizmaları Şekil 4'ün alt kısmında sunulmuştur, pıhtılaşma bağımlı anjiyogenez ve DF aynı zamanda trombin oluşumu, fibrin birikimi yoluyla pıhtılaşma bağımlı anjiyogeneze neden olabilir. Protrombinaz kompleksinden trombin oluşumu, fibrinojen molekülünden fibrinopeptid A (FPA) ve fibrinopeptid B (FPB)'yi ayıran ve sonuçta çözülmüş fibrinojenden fibrin iplikçiklerini oluşturan bir aktif serin proteazdan kaynaklanır. FPA'nın artmış plazma seviyesi tümör büyümesi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Trombin ayrıca plateletleri aktive eder. Fibrin iplikleri ile aktive edilmiş plateletlerin birikimi pıhtı oluşturur. Pıhtı oluşumu ve erimesi tümör büyümesi ve anjiyogenezine neden olur. Aktive olmuş plateletler α granüllerinden, tümör ve endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu artışına neden olan VEGF, bFGF ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PKBF) içeren birçok proanjiyogenik ajanlar salıverir. VEGF, tümör hücreleri etrafında ekstraselüler fibrin iplikçığı matrisine sebep olan plazma protein sızıntısına neden olur. Bu matris endotelial hücre migrasyonu ve tübül oluşumunu kolaylaştıran bir destekleyici iskele olarak görev yapar. Fibrin matrisinin fibronilitik bozulması ayrıca anjiyogeneze neden olur, çünkü bozulma, hücre adhezyonu ve migrasyonunu kolaylaştırıcı proanjiyogenik gizli bölgelerin maruziyetine ve küçük proanjiyogenik parçaların ve ayrılmış büyüme faktörlerinin salınımına neden olur.

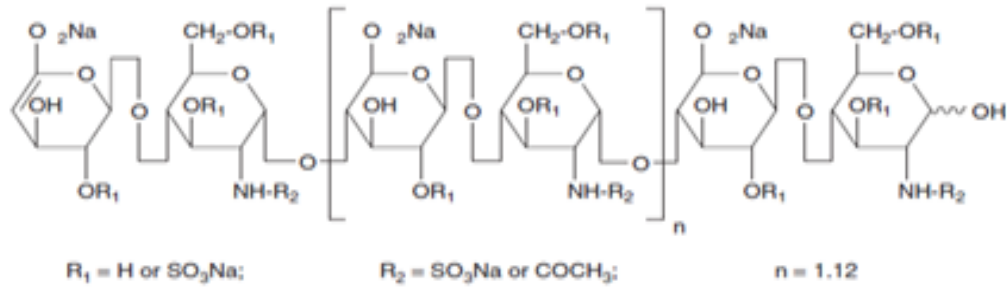
4.7. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinler

Düşük molekül ağırlıklı heparinler kimyasal veya kontrollü enzimatik depolimerizasyon ile heparinlerden türetilmiştir ve 3 000-6 000 Dalton ağırlığı arasında daha düşük ortalama ağırlığa sahiptir ve zincir uzunlukları 12-18 sakkarid birim içerir. Avrupa'da 1980'lerin ortasından beri kullanılmaktadır. DMAH'ler Amerika'da ilk olarak 1993 yılında venöz tromboz tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (132, 133).

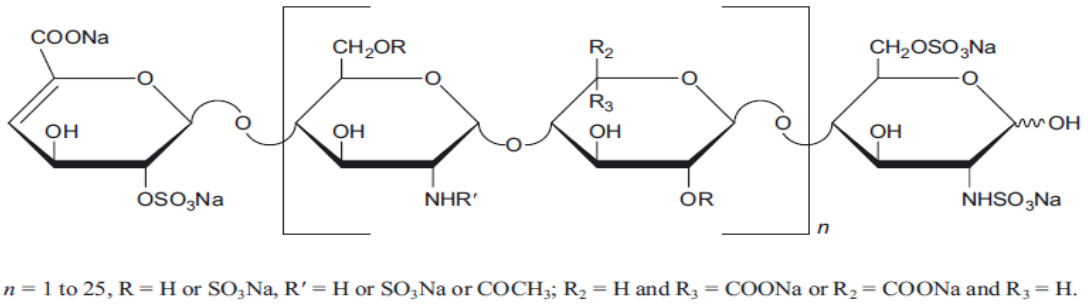
Düşük molekül ağırlıklı heparinler farklı depolimerizasyon yöntemleriyle üretildikleri için farmakokinetik ve antikoagülan özellikleri yönünden bazı farklılıklar içerirler (6, 134). DMAH'lerin karşılaştırmalı bu özellikleri Tablo 1'de (133) ve sırası ile bemiparin, tinzaparin ve enoksaparin'in kimyasal yapıları Şekil 5, 6 ve 7'de sunulmuştur. DMAH'ler standart heparinden farklı olarak cilt altına uygulanır. Bu uygulama sonrası biyoyararlanımı artar, yarılanma ömrü uzar. Ayrıca farmakokinetik özellikleri olarak trombositopeninin azalması ve daha çok tahmin edilebilir doz cevabı ile önemli avantajlar sunmaktadır (132, 135). Bu avantajlar, antikoagülan olarak kanser tedavisinde daha yoğun olarak kullanımına yol açmıştır. DMAH'lerin standart heparinlere göre klinik açıdan kanser hastalarında venöz tromboz tedavisinde mortaliteyi önemli derece azalttığını gösteren çalışmalar vardır (136). Bununla birlikte kafa karıştırıcı farklı klinik çalışmalarda vardır ve venöz trombozu olmayan veya profilaksi açısından kanser hastalarında yaşam süresini uzatmak amacıyla DMAH tedavisi henüz onay almamıştır (6, 133, 137-140). Bundan dolayı DMAH'lerin potansiyel rolü ek değerlendirmelere ihtiyaç göstermektedir. Özellikle bu çalışmalar, muhtemel tedavi cevabı için kanser tipi ve evresinin yanı sıra optimum cevap dozu ve süresini de belirleyecek odaklı olmak zorunda olduğu iddia edilmektedir (141).

Tablo 1. Antianjiyogenik etkili ultra düşük molekül ağırlıklı heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparinlerin listesi (133)

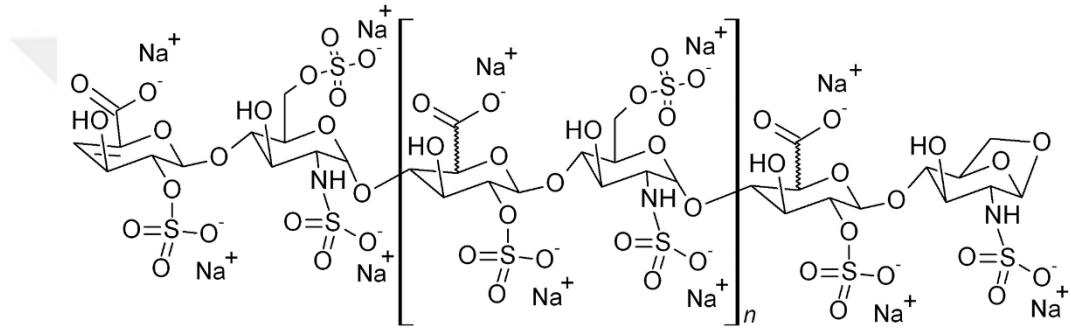
Heparin jenerasyon	İsim	Ticari isim	Hazırlama metodu	Ortalama Molekül Ağırlığı (Da)
1.Jenerasyon	Tinzaparin	İnnohep	Heparinaz depolimerizasyon	6 500
	Daltaparin	Fragmin	Nitröz asit depolimerizasyon	6 000
	Enoksaparin	Clexane	Benzilasyon ve alkali hidroliz	4 500
	Nadroparin	Fraxiparin	Nitröz asit depolimerizasyon	4 500
	Reviparin	Clivarin	Nitröz asit depolimerizasyon	4 500
2.Jenerasyon	Bemiparin	Hibor, Badyket	Kimyasal β -eleme depolimerizasyon	3 500
	UDMAH (RO-14)	-----	Kimyasal β -eleme depolimerizasyon	2 200



Şekil 5. Bemiparin'in kimyasal yapısı (142)



Şekil 6. Tinzaparin'in kimyasal yapısı (143)



Şekil 7. Enoksaparin'in kimyasal yapısı (Wikipedia, Walkerma'dan)

Anjiyogenez; kapiller damar lümeninin oluşumu, proteolitik enzimler tarafından (heparinaz gibi) ECM'nin parçalanması ve endotel hücrelerin göçü, proliferasyonu ve aktivasyonunu içeren çok basamaklı kompleks bir süreçlerden oluşmaktadır (142). DF ve DFYİ heparin bağlayan proteinlerdir ve kanser büyümesi, metastazı ve anjiyogenezinin düzenlenmesinde rollerinin olduğu tezi pek çok çalışmada vurgulanmaktadır (6, 144-147).

Düşük molekül ağırlıklı heparinler anjiyogenezi, büyüme faktörlerini (VEGF ve bFGF) ve onların inhibitörlerinin sentezini düzenleyerek etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (136, 148, 149).

Düşük molekül ağırlıklı heparinler ortalama molekül ağırlıkları 2 000 ile 6 000 dalton arasında olup hem antikoagülan hemde antianjiyogenik özellik göstermektedirler (133, 135, 149). Bu moleküllerin ortalama ağırlıkları farklılık gösterir bu farklılıklar; üretim aşamasından kaynaklı makro moleküler zincirler arasındaki sülfat grublarının

dağılımı ve sülfat yoğunluğu farkından kaynaklanır. Bu farklılıklar antikoagülan ve olası antikanser mekanizmasını etkileyici olabilir (6).

Doku faktörü yolu inhibitörü heparin bağlayıcı bir proteindir ve DMAH'ler DF'nin aktivesini baskılayıp, tümör büyümesini inhibe eden DFYİ'nin salınımını sağlayarak etki gösterdiği fikri pek çok çalışmada desteklenmiştir (135, 137, 148, 150-152).

4.8. *In vivo* Anjiyogenez Modelleri

Anjiyogenez birçok hastalığın patofizyolojinde rol alır ve süreci pozitif ve negatif etkileyen moleküller arasındaki dengeye bağlı kontrol edilir. Bu kavram, “anjiyogenik anahtar (switch)” olarak adlandırılır (3). Pozitif etkili pro-anjiyogenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Dokuların ve moleküllerin heterojenitesini ve anjiyogenik reaksiyonların hücrel karmaşıklığını düşündüğümüzde, araştırma açısından tamamıyla yeterli tek bir ölçüm yönteminin en uygun şartları karşılamasının mümkün olamayacağı açıktır. Bu nedenle, araştırma amaçlı birçok *in vitro* ve *in vivo* anjiyogenez çalışma modeli önerilmiştir. Anjiyogenez süreciyle ilgili *in vitro* modeller önemli bilgiler sunmakla birlikte, *in vivo* etkinin ne olacağını tam olarak gösteremez. Anjiyogenez araştırmalarında kullanılan *in vivo* modellerin bir kısmı, tarama amaçlı kullanılırken, diğerleri doz-etkinlik, moleküler yapısal aktivite ve birden çok ajanın anjiyogenez üzerine kombine etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır (153). Anjiyogenez de kullanılan başlıca *in vivo* modeller:

- Cıvcıv koriyoallantoik membran modeli (CAM)
- Tavşan kornea modeli (“micropocket”)
- Rodent mezenter modeli
- Sünger (“Sponge”) implant modeli
- Matrijel ve klasik tümör modeli
- Zebrabalık modeli'dir.

Ancak uygulanması en kolay, basit, tekrarlanabilir ve anjiyogenik cevabın kantitatif ölçümüne imkan veren çalışma modellerinin CAM ve tavşan kornea yöntemleri olduğu kabul edilmektedir (5, 6). Anjiyogenezde tarama amaçlı ve en çok kullanılan modellerin CAM, tavşan kornea ve matrijel modelleri olduğu bildirilmektedir (154). İdeal anjiyogenez çalışma modelleri aşağıdaki ihtiyaçları karşılamalıdır;

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

Yukarıda sayılan nedenler dikkate alındığında, CAM modeli uygun bir *in vivo* model olarak, kanser davranışlarının ortaya konmasında, biyomateriyallerin etkilerinin incelenmesinde, fotodinamik tedavi yaklaşımlarında ve en son olarak anjiyogeneizde sıklıkla kullanılan uygun bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Cıvciv koryoallantoik membran ekstraembriyonik bir membran olup, hem anjiyogenez hem de anti-anjiyogenez çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Cıvciv koryoallantoik membranda anjiyogenez, gelişimsel olarak üç safhadan oluşur:

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

Erken fazda, kapiller ağ filizlenmeye başlar. Ara fazda, mikrovasküler ağda gelişim öne çıkar, filizlenme bu aşamada sona erer. Son fazda, koriyoallantoik ögeler tam bir koruyucu membrana dönüşür ve genişlemesi tamamlanır. Uygulamaların 18. güne kadar yapılabilmesi mümkündür ancak, bu günden sonra embriyonun yeterince büyümesi ve hareketlerinin artması, uygulamaları olumsuz etkilemektedir.

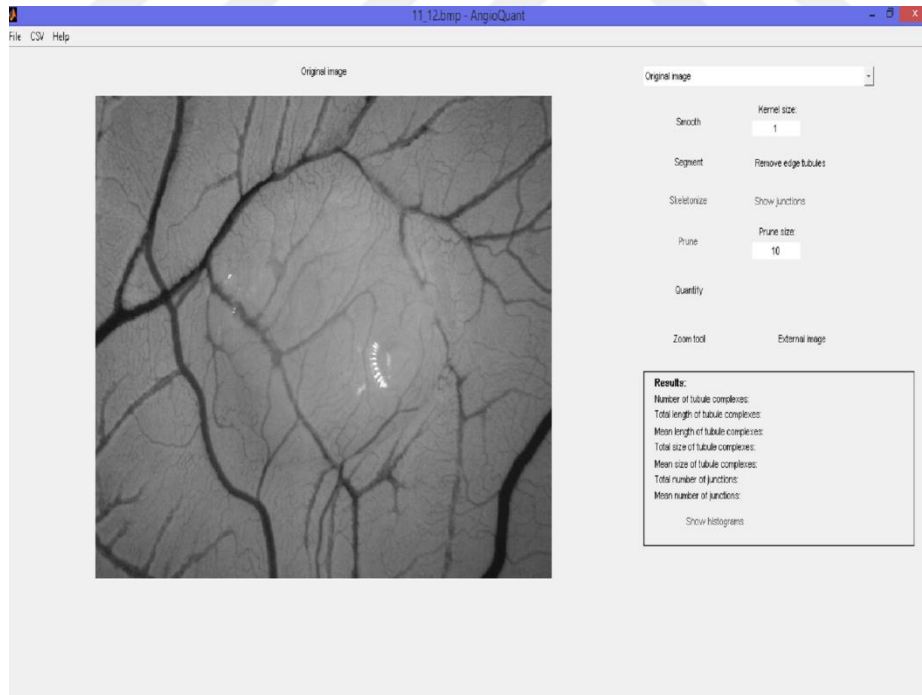
Civciv koryoallantoik membran model uygulamalarının dezavantajları; bu çalışma modelinin en temel kısıtlaması, nonspesifik inflamasyon reaksiyonlarıdır. Fiziksel ve kimyasal travma hücrel hasarlanmaya ve inflamasyonun tetiklenmesine neden olur. Bu nedenle travma bazlı ölçümler, çalışmanın duyarlılığını ve özgüllüğünü düşürür. Bu nedenle, inflamatuvar süreçlerden kaçınmak ve uzak durmanın gerekliliği açıktır. Bunlar bazen yumurtanın kırık kabuk parçalarından dahi başlayabilir, o yüzden mümkün olduğunca temiz çalışılması önerilir. Bir diğer kısıtlama, gerçek neovaskülarizasyonun artmış vasküler dansiteden ayırt edilme güçlüğüdür. Aynı zamanda, gelişmeleri görüntüleme güçlükleri de çalışmaları zorlaştırmaktadır. Uygulama sonrası değerlendirmelerin yapılacağı zaman konusunda da çeşitli farklı fikirler olmasına karşın, eğer anjiyogenik bir ajan deneniyorsa 48-72 saat sonra değerlendirmenin aksine, antianjiyogenik bir ajan deneniyorsa 24-48 saat sonra sonuçları değerlendirmenin uygun olduğu kabul edilmektedir (4). Bir diğer konu ise, kabuk kırıldıktan sonra havayla temasın çok iyi bir şekilde önlenmesi ve izolasyonudur. Sonuçların değerlendirileceği döneme kadar kabukta açılan pencerenin izolasyonunun bozulmaması gerekir, çünkü hava basıncı değişiklikleri uygulama sonuçlarını etkileyebilir (153).

Civciv koryoallantoik membran uygulamalarının avantajları ise; bu modelde çalışmanın en temel avantajları arasında, çalışma yapılacak döllenmiş yumurtaların temininin ucuz ve kolay oluşu gelmektedir. Ayrıca, bu model üzerinde yapılacak çalışmaların hayvan etik kurul onayı gerektirmemesi bir diğer avantajdır. Bu modelle yapılan çalışmalarda sonuçlara çok kısa sürede ulaşmak mümkündür. Çalışma sonuçları gözle rahatlıkla saptanabildiği gibi, uygun şartlarda fikse edilen preparatlarda ışık mikroskobundan elektron mikroskobuna kadar değişik duyarlılıkta histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılabilir. Ayrıca fikse edilmeyen örneklerde, DNA ve kollajen ölçülmesi mümkün olduğu gibi, istenirse gen ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışılabilir (153). Anjiyogenez konusunda *in vivo* model olarak birçok yaklaşım mevcuttur.

4.9. Anjiyogenez Görüntü Analiz Programları

In vitro Anjiyogenez çalışmaları için dijital görüntü analiz yapan birçok program bulunmaktadır, bunlardan bazıları; Angio Tool, Angiosys, Wimasis ve Angioquant gibi otomatik analiz yapanların olduğu gibi ImageJ gibi manuel ölçüm yapılabilecek programlar da bulunmaktadır. Bu programların pek çoğu red-blue-gray (RBG) olarak adlandırılan renkli görüntülerin gri tonlu (gray scale) formatta ikinci bir görüntünün oluşturulması temeline dayalıdır ve görüntünün koyuluk ve aydınlık derecesine göre düşük ve yüksek eşik değerleriyle ölçülecek damarlar belirlenmektedir. Belirlenen damarlar kavşak noktalarına göre uzunluk, boyut ve kavşak sayısı hesaplanmaktadır. Ayrıca bu programlar piksel olarak ölçüm yapılabildiği gibi pikselin istenilen ölçüm birimine ayarlanmasıyla da farklı uzunluk biriminde ölçüm yapılabilmektedir.

Angioquant programı birçok çalışmada kullanılmış olup <http://www.cs.tut.fi/sgn/csb/angioquant/> internet adresinden ücretsiz ulaşabilmektedir (155-164). Ayrıca bu program MATLAB yazılımı ile birlikte çalışmaktadır. Şekil 8’da programın çekilen fotoğraf ara yüzünden nasıl değerlendirme yaptığı sunulmuştur.



Şekil 8. Angioquant programının genel görünümü

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma altı gruptan oluşturulmuştur, Grup I. Agaroza (kontrol), Grup II. Bevacizumab, Grup III. Setuksimab, Grup IV. Bemiparin, Grup V. Enoksaparin Grup VI. Tinzaparin'dir. Çalışmada her bir grup sayısı yedi olup toplam 42 fertilize Austrolorps cinsi yumurta kullanılmıştır. Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda Aralık 2015 ve Ocak 2016 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Çalışmanın yapıldığı laboratuvar

5.2. Malzemeler ve Deneyin Yapılışı

Çalışmada kullanılan malzemeler ve laboratuvarımızda bulunmayıp satın alınan malzemelerin marka ve firması;

1. 96 yumurta kapasiteli ve iki saat arayla yumurtaları çevirici kuluçka makinesi (YZ96-B inkübatör, Sare ticaret -İstanbul)
2. Mikrodalga fırın (Beko MD 1510)

3. Mikropipet (10 ve 100 µl)
4. 1000X 2.0 MP 8-LED USB Dijital Mikroskop
5. 10µl lik steril öze (Lp Italiana Spa, İtalya)
6. Erlenmayer (250 ml)
7. Deney tüpleri
8. Çalkalamalı su banyosu (Termal H11900, İstanbul)
9. Tüp karıştırıcısı (Ika MS2 Vorteks, Çin)
10. Hassas tartı (Shimadzu Aux 220, Amerika)
11. Parafilm
12. Agaroz 100 mg (Sigma-Aldrich, Amerika)
13. Hibor (7 500 İÜ Rovi Laboratuvarları, İspanya)
14. Altuzan (100 mg/4 ml flakon Rouche Müstehzarları A.Ş., İstanbul)
15. İnnohep (14 000 İÜ 0.7 ml Leo Pharma, Danimarka)
16. Clexane (6 000 İÜ Aventis Intercontinental, Fransa)
17. Ebitux (100 mg/20 ml flakon Merck KGaA Darmstadt, Almanya)
18. 5 ml'lik enjektörler.

Fertilize yumurtalar kuluçka makinesine yerleştirilmeden önce, kuluçka makinesi sıcaklığı 37 °C ve nemi %65 olacak şekilde ayarlandı ve yumurtalar sivri ucu aşağıda olacak şekilde yumurta haznelere yerleştirildi. Fertilize olduğu iddia edilen yumurtalar %50 oranında fertilize olmama ihtimaline karşı grup sayısını tutturmak için iki kat yumurta kuluçka makinesine yerleştirilmiştir. İnkübasyonun (kuluçka döneminin) beşinci gününde hem yumurtaları kontrol etmek hem de CAM'nın aşağı çekilip daha iyi gözlem yapılabilmesi için her bir yumurtanın sivri uç kısmına yakın yerden 5 ml lik bir enjektör yardımı ile 5 ml albumün çekilmiştir (Şekil 10). Albumün çekildikten sonra yumurtaların küt uçlarından 2-3 cm lik delikler açılmıştır (Şekil 11) ve daha sonra bu delikler parafilm ile kapatılarak tekrar inkübasyon için kuluçka makinesine yerleştirilmiştir (Şekil 12).

İnkübasyonun sekizinci gününde 10 µl şeklinde hazırlanan ilaç pelletleri (Şekil 13) CAM üzerine yerleştirilmiştir (Şekil 14). İlaç uygulamasından 12, 24 ve 36 saat sonra, damarlanmayı (anjyogenezi) değerlendirmek için dijital kamera yardımı ile her bir yumurtanın fotoğrafı çekilmiştir. Çekilen fotoğraflar Angioquant programı ile

otomatik olarak, İmageJ programı ile ise manuel damar uzunluk ve kavşakları analiz edilmiştir.



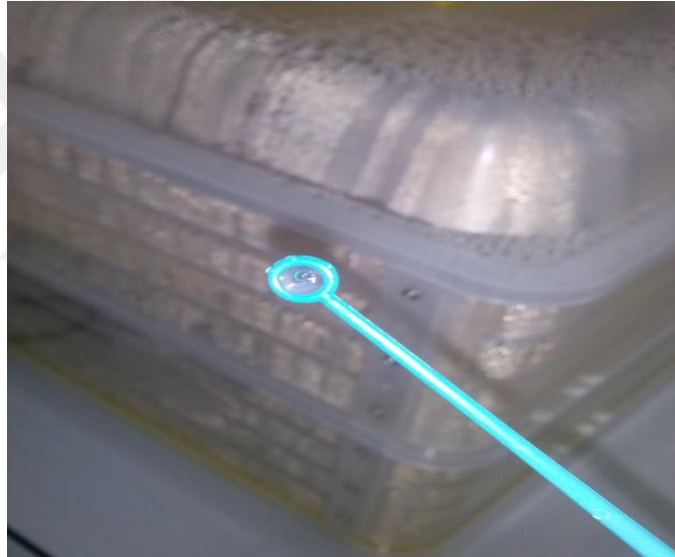
Şekil 10. 5 cc lik enjektör ile yumurtadan albümin çekilmesi



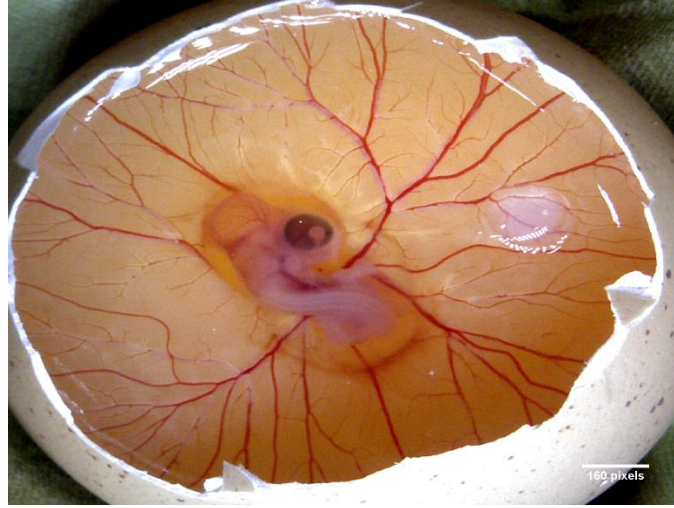
Şekil 11. Yumurtanın küt (sivri olmayan uç) ucundan 2-3 cm'lik delik açılması



Şekil 12. Yumurtaların deliklerinin parafilm ile kapatılması ve kuluçka makinesine yerleştirilmesi



Şekil 13. 10 μ l ve 5 mm ϕ nda şeffaf yapıda oluşturulan pellet



Şekil 14. Koryoallantoik membran üzerine pelletin yerleştirilmesi

5.3. İlaç Hazırlama

Bu çalışmada ilaçların topikal olarak uygulanabilmesi için pellet şeklinde hazırlanması gereklidir ve bu pelletler şu şekilde hazırlanmıştır;

- 200 ml saf su ile 5 gram agaroz bir erlende karıştırılıp, daha sonra kaynaması için mikrodalga fırına yerleştirilmiştir.
- Yaklaşık on dakika fırında kaynatılarak 40 °C ye kadar oda sıcaklığında soğutulmaya bırakılarak %2,5 luk agaroz çözeltisi hazırlanmıştır.
- Sıcaklığı 40 °C'ye kadar soğutulan çözelti agarozun donma sıcaklığı olan 34-37 °C nin üzerinde bir sıcaklıkta su banyosunda tutularak sıcaklık sabitlenmiştir (ilaç-agaroz karışımı 37°C'nin üstünde ve 40 °C nin altında karıştırılması gerekir).

Bemiparin grubu için 50 İÜ/10 µl pellet (2 µl bemiparin 8 µl agaroz) oluşturmak için 1,5 ml Hibor 7 500 İÜ ve 6 ml agaroz çözeltisi bir tüpe konularak vorteks'de karıştırılmıştır. Karıştırılan bu tüpden 10 µl lik yumurta sayısı kadar pellet oluşturulmuştur, her bir pellet 10 µl kapasiteli bir öze yardımıyla yapılmıştır (Şekil 13). Oluşturulan pelletler CAM'a bırakılmadan önce 5-15 dakika oda sıcaklığında bekletilip daha sonra CAM'a yerleştirilmiştir (Şekil 14).

Benzer işlemler diğer gruplar içinde gerçekleştirilmiştir ve diğer gruplar için karışımlar şu şekilde hazırlanmıştır;

- Tinzaparin grubu için 50 İÜ/10 µl pellet (2,5 µl tinzaparin 7,5 µl agaroz) oluşturmak için 2 ml İnnohep 14 000 İÜ ve 6 ml agaroz.
- Enoksaparin grubu için 50 İÜ/10 µl pellet (5 µl enoksaparin 5 µl agaroz) oluşturmak için 3 ml Clexane 6 000 İÜ ve 3 ml agaroz.
- Setuksimab grubu için 0,035 mg/10 µl pellet (7 µl setuksimab 3 µl agaroz) oluşturmak için 7 ml Erbitux 100 mg/20 ml ve 3 ml agaroz.
- Bevacizumab grubu için 0,125 mg/10 µl pellet (5 µl bevacizumab 5 µl agaroz) oluşturmak için 4 ml altuzan 100 mg/4 ml (flakonun tamamı) ve 4 ml agaroz.
- Kontrol grubu için 0,025 mg/10 µl pellet olacak şekilde 5 ml agaroz tüpe konulup 10 µl'lik pelletler oluşturulmuştur.

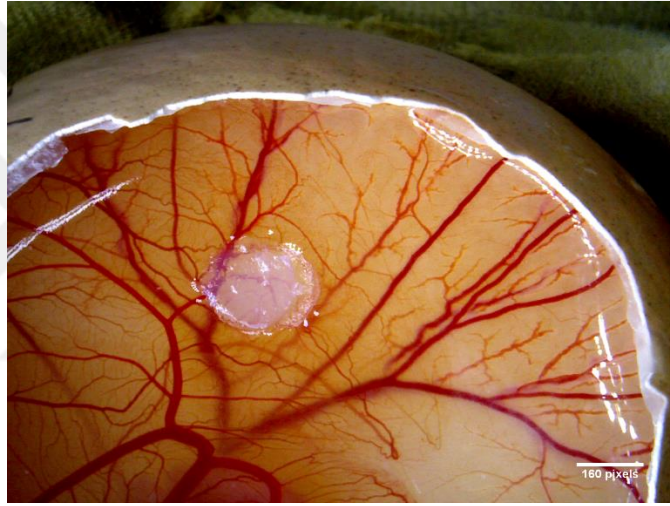
5.4. Görüntü Analiz

Sunulan bu çalışmada her bir gruba ait her bir yumurtanın ilaç uygulamasından hemen sonra (0. saat), 12, 24 ve 36 saat sonra genel görünüm ve daha yakın görüntü fotoğrafları çekilmiştir. Çekilen bu görüntülerden uygulanan 5 mm lik pelletin bir katı çapında (pellet + pellet çapının bir katı pellet etrafı) bir alan analiz için yeniden boyutlandırılmıştır. Analiz için kullanılan görüntü resimleri Paint programı ile 1600x1200 piksel boyutunda ve 24 bit derinliğindeki formata dönüştürüldü. Görüntü analizleri iki farklı yazılım programı ile analiz edilmiştir. Bu programlardan Angioquant programı ile otomatik analiz, ikincisi ise ImageJ programı ile manuel analiz yapılmıştır.

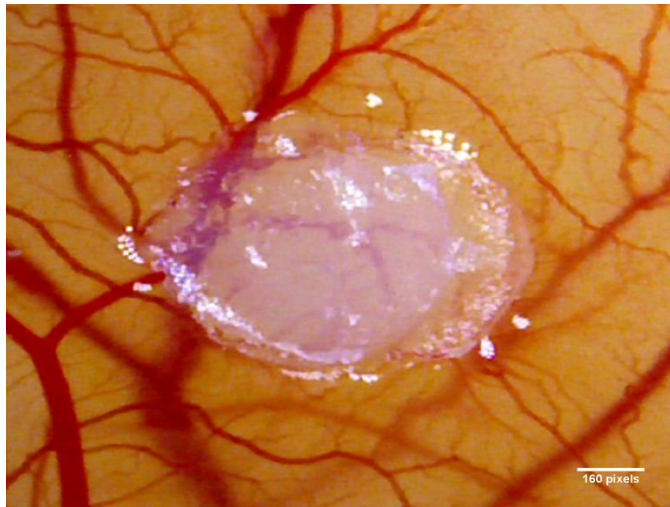
Angioquant programında analiz basamakları şöyledir (Şekil 15-22); birinci basamak olarak analiz edilecek resim seçilir ve resmin gri tonlu ikili bir görüntüsü oluştur, ikinci basamak olarak resmi netleştirmek için düzleştirme işlemi yapılır. Üçüncü basamakta segmentasyon yapılır, segmentasyon analizin doğru yapılması için en önemli basamaktır. Segmentasyon düşük ve yüksek eşik değerleri program tarafından otomatik belirlenir, yüksek eşik damarların üst kısmında bulunan fibroblastları ve damarın diğer alanlardan daha koyu olarak algılanmasıyla oluşturulur. Düşük eşik ise sadece koyuluğu algılamasıyla belirler. Program segmentasyon aşamasında eşik değerlerinin doğru algılanması için eşiklerin ayarlanmasına imkanı da tanımaktadır. Segmentasyon aşamasından sonra dördüncü basamak iskeletlendirmedir, program algılanan damarların iskeletlendirilerek damar uzunluğunu ve damar kavşakları

piksel olarak hesaplamaktadır. Program hesaplanan damarsal değerlerin total ve ortalamalarını vermektedir. Son aşama budama basamağıdır ve bu basamakta iskeletlendirme sonrasında hesaplanan çok küçük piksel değerlerinin hesaplamadan çıkartılmasıdır. Bu basamakta da program istenilen piksel değerini budamaya imkan tanımaktadır. En son basamak uygulandıktan sonra resim ve sonuçlar kaydedilir. Güplara ait orijinal görüntüler ve program için ayarlanmış görüntülere ait birer örnek Şekil 23 ve 24’de sunulmuştur.

Sunulan bu çalışmada program tarafından hesaplanan damar uzunluk ve damar kavşaklarının ortalamalarını 12, 24 ve 36. saatlerin 0. saate göre değişim katsayıları hesaplanmıştır.



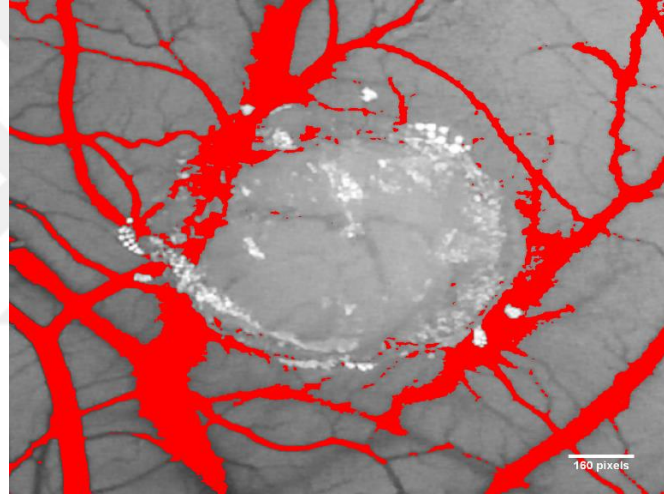
Şekil 15. Analiz için çekilmiş genel görünüm fotoğraf



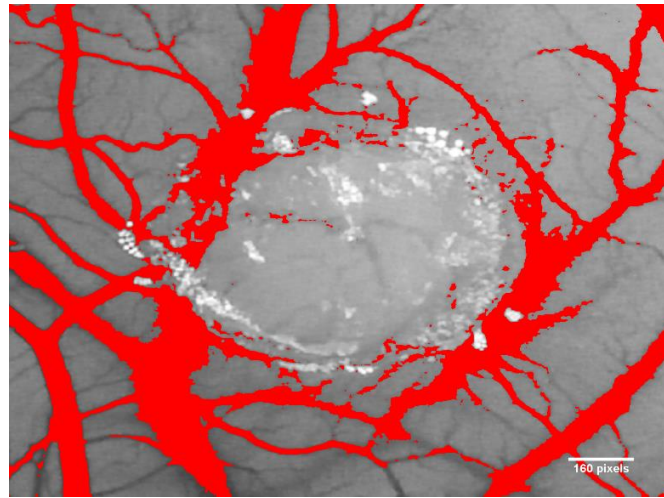
Şekil 16. Genel görünümlü fotoğrafın pelletin bir katı alan olacak şekilde ayarlanması



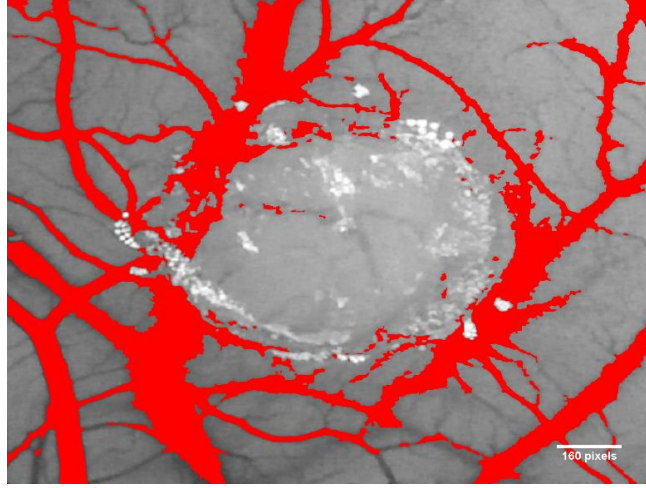
Şekil 17. Angioquant programın fotoğrafı gri tonlu görüntü haline getirme



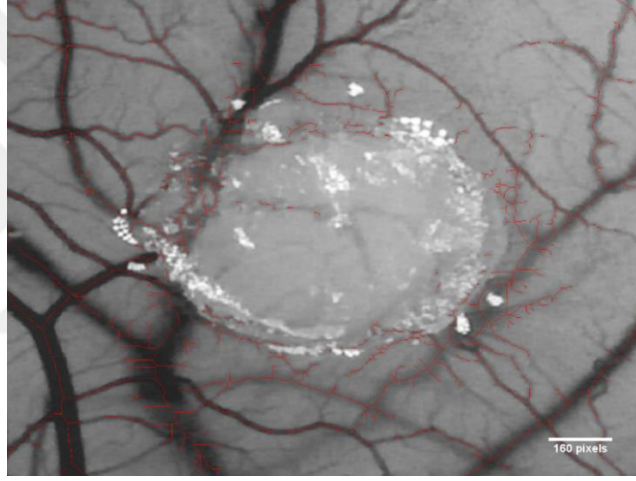
Şekil 18. Angioquant programın fotoğrafın düşük eşik görüntüsü



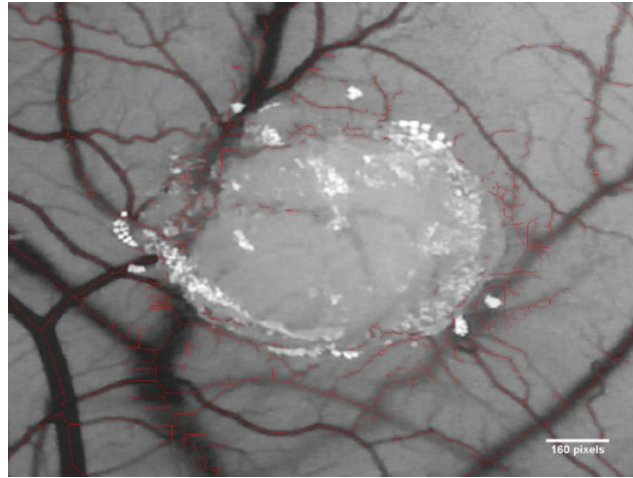
Şekil 19. Angioquant programın fotoğrafın yüksek eşik görüntüsü



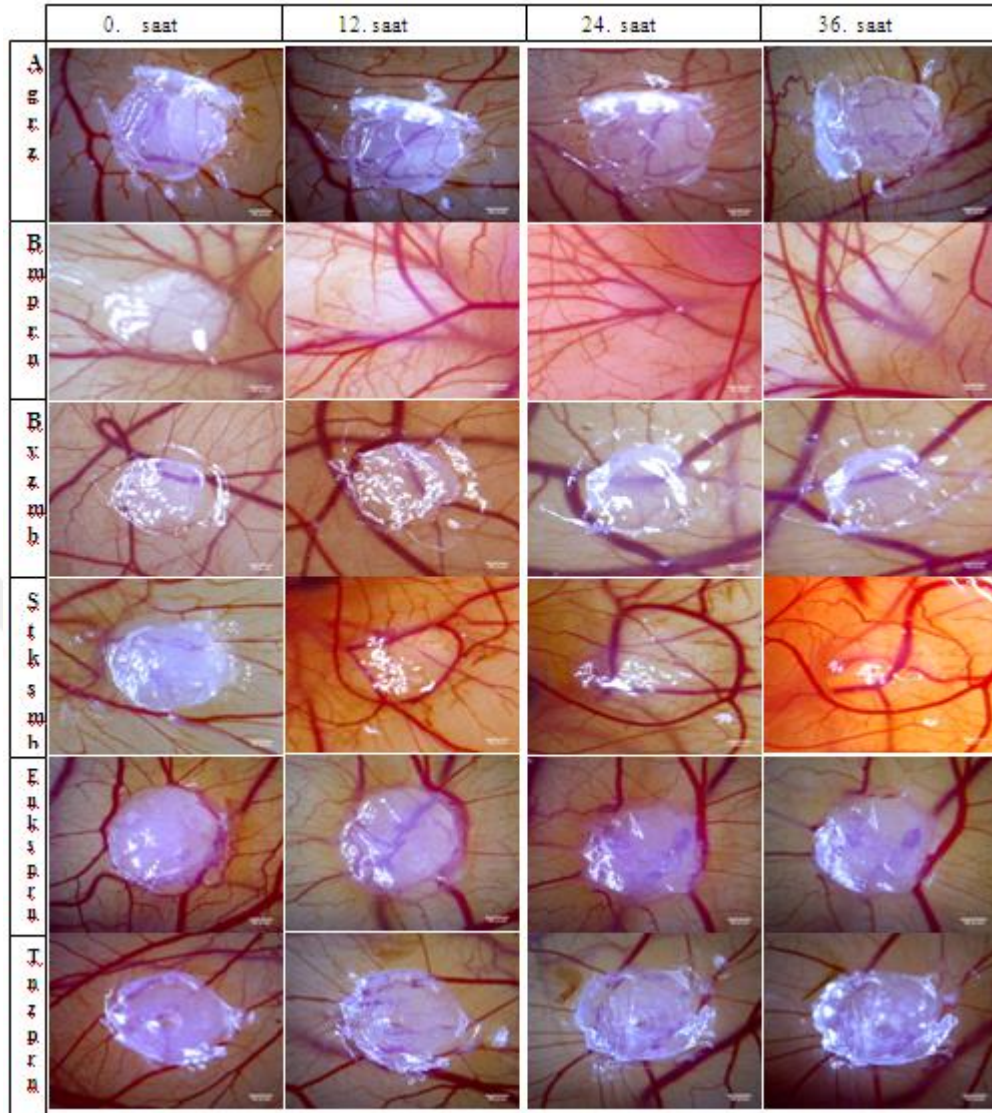
Şekil 20. Angioquant programına ait fotoğrafın segmentasyon görüntüsü



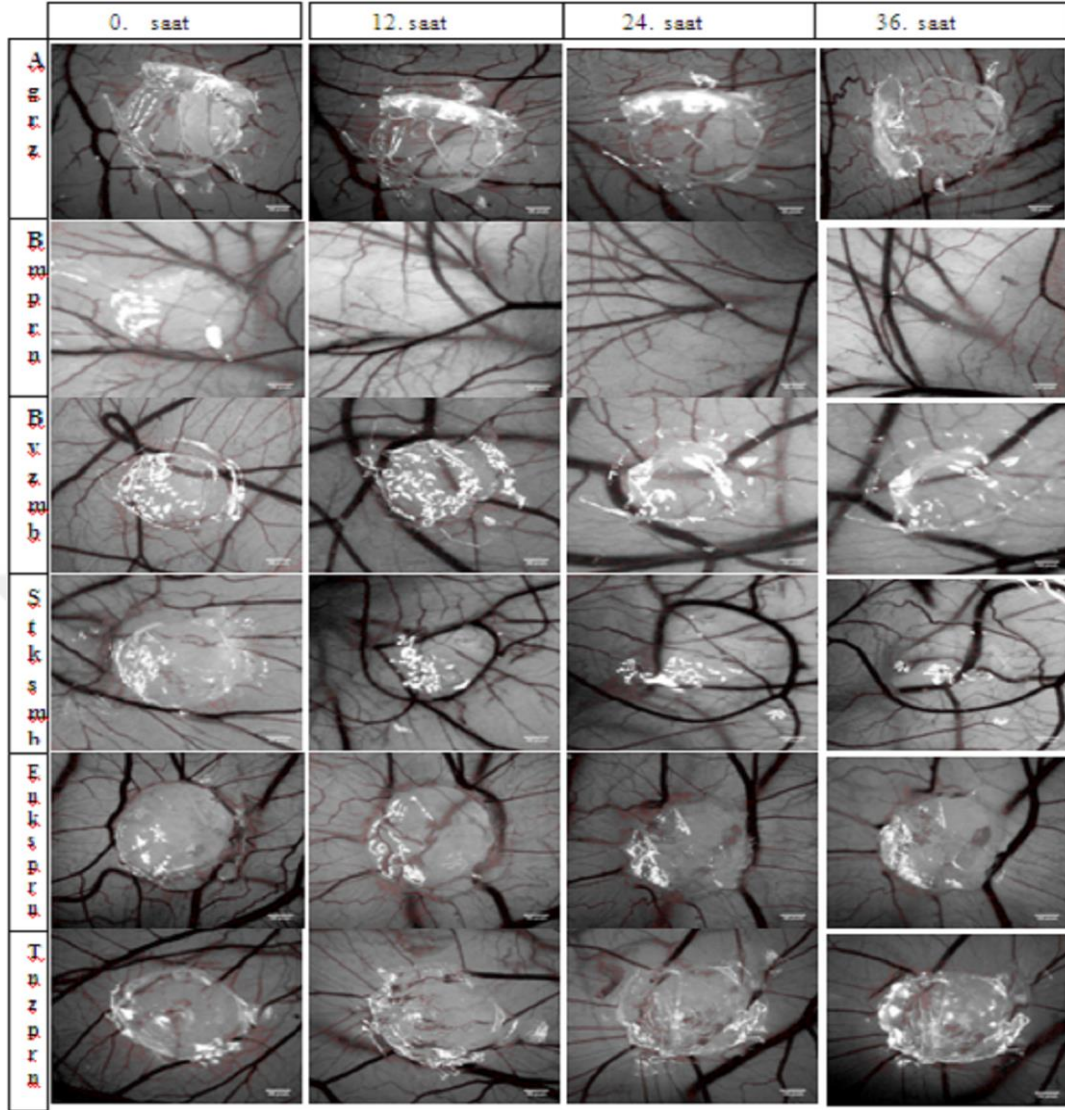
Şekil 21. Angioquant programına ait fotoğrafın iskeletlendirilmesi



Şekil 22. Angioquant programına ait fotoğrafın 10 pikselden daha küçük ölçümlerinin budanması



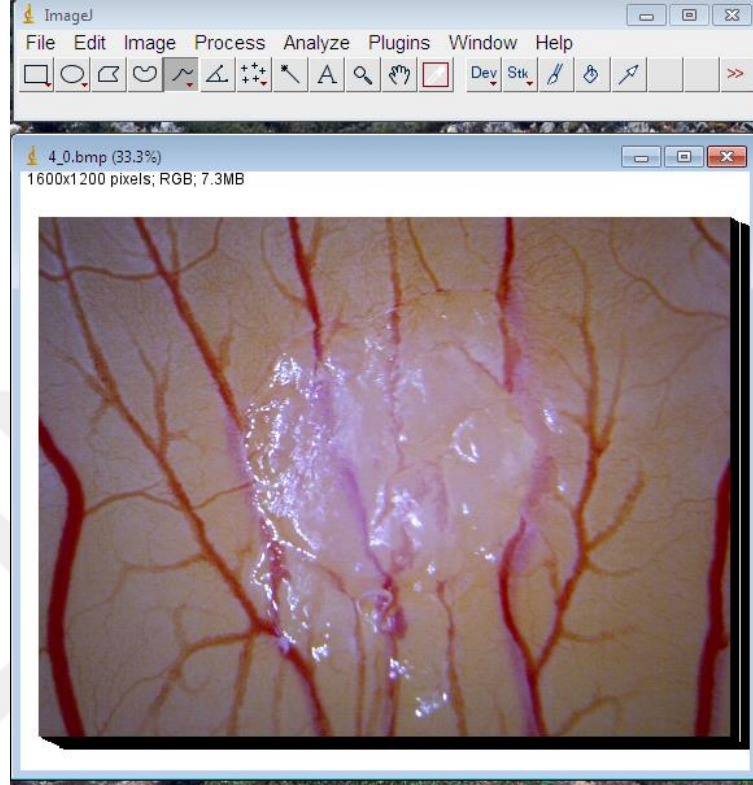
Şekil 23. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait orjinal resim örnekleri



Şekil 24. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait otomatik analiz resim örnekleri

İkinci analiz yöntemi olan manual analiz ise İmageJ programı (Şekil 25’de genel görünümü sunulmuştur) yardımı ile görüntüdeki damarlar “freehand line” çizim seçeneği kullanılarak damarların üzerinden geçilerek uzunlukları piksel olarak program tarafından hesaplanmıştır. Programda damarın her üzeri çizilme sonunda “analyze-measure” ile uzunluk ölçümü kayıt edilir ve tüm damarlar daha sonra Excel formatında kayıt edilen sonuçlar toplanarak görüntüdeki toplam damar uzunluğu hesaplanır. Kavşaklar ise “multi-point” seçeneği ile kavşak noktaları olan yerlere işaretlenir, her işaret program tarafından numaralandırılarak damar kavşakları sayılır (Şekil 26 ve 27’de orijinal ve manuel analiz edilen bir örnek, Şekil 28’de gruplara ait manuel ölçüm örnekleri sunulmuştur).

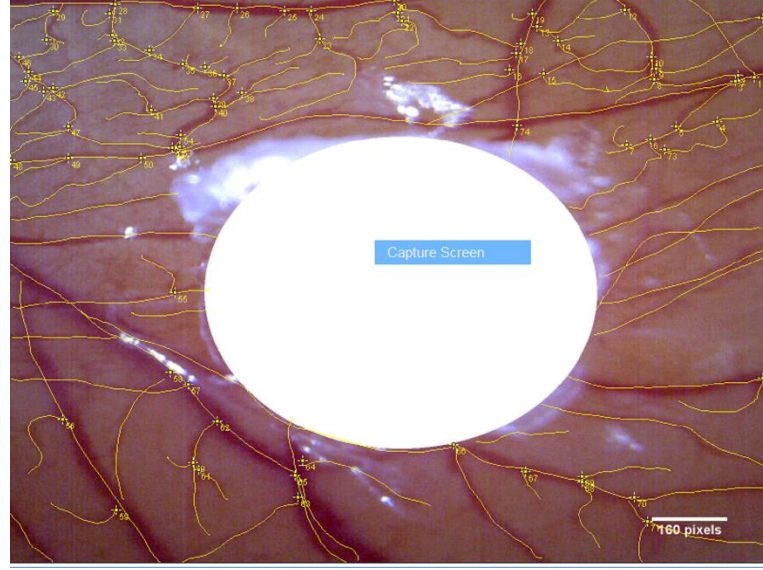
Otomatik analizde damar uzunluk ve kavşak sayımı pellet + pelletin $\frac{1}{2}$ çapının bir katı alanda sayım yapılır iken, manuel ölçümde sadece pellet $\frac{1}{2}$ çapının bir kat etrafında sayım yapılmıştır yani pelletin bulunduğu alan hesaplanmamıştır.



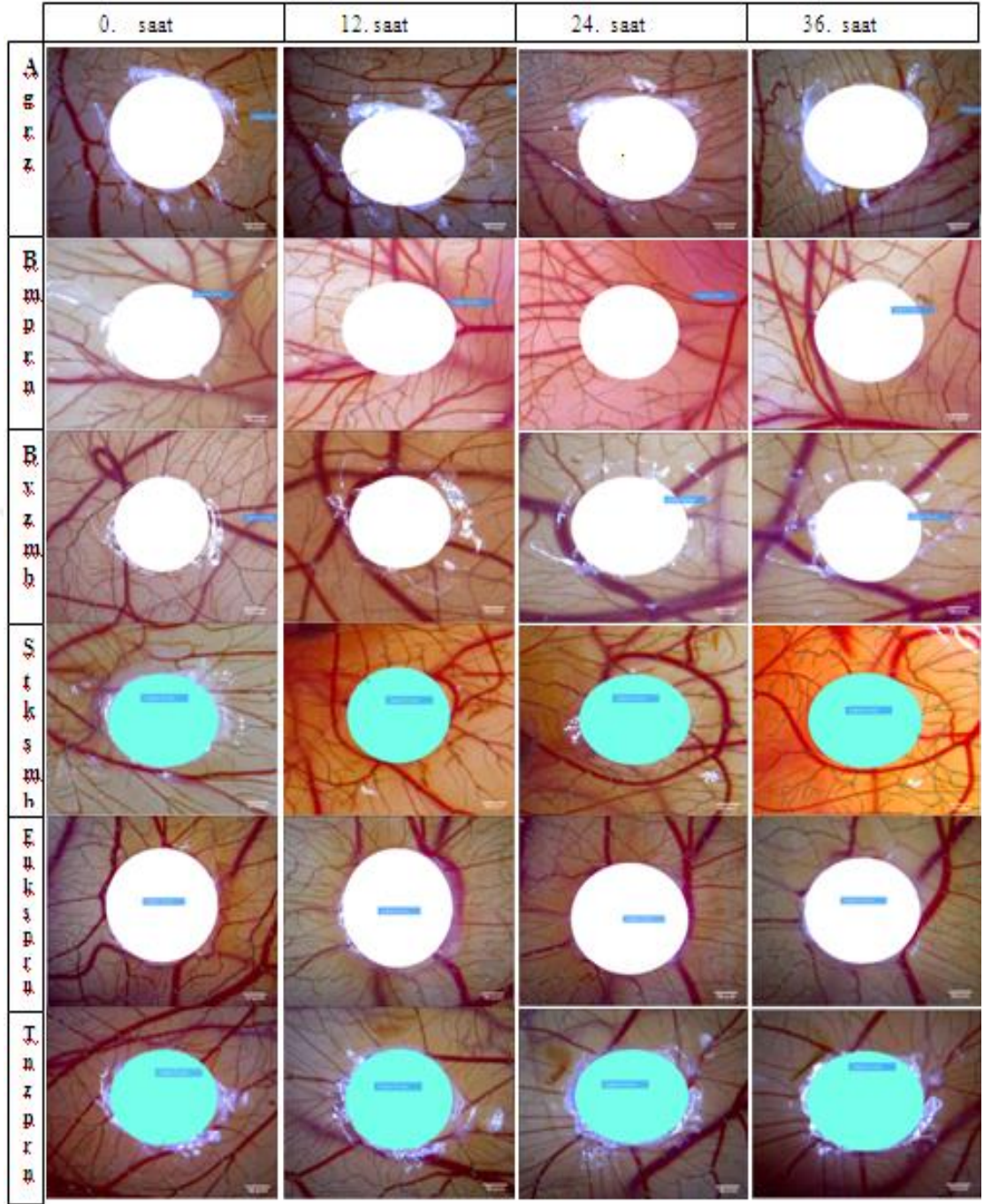
Şekil 25. ImageJ programının örnek bir fotoğraf ile genel görünümü



Şekil 26. ImageJ programı ile yapılan damar uzunluk ve kavşak sayımı için orijinal görüntü



Şekil 27. İmageJ programı ile yapılan damar uzunluk ve kavşak sayımı örneği



Şekil 28. Her bir grubun 0, 12, 24 ve 36. saat görünümüne ait manuel ölçüm örnekleri

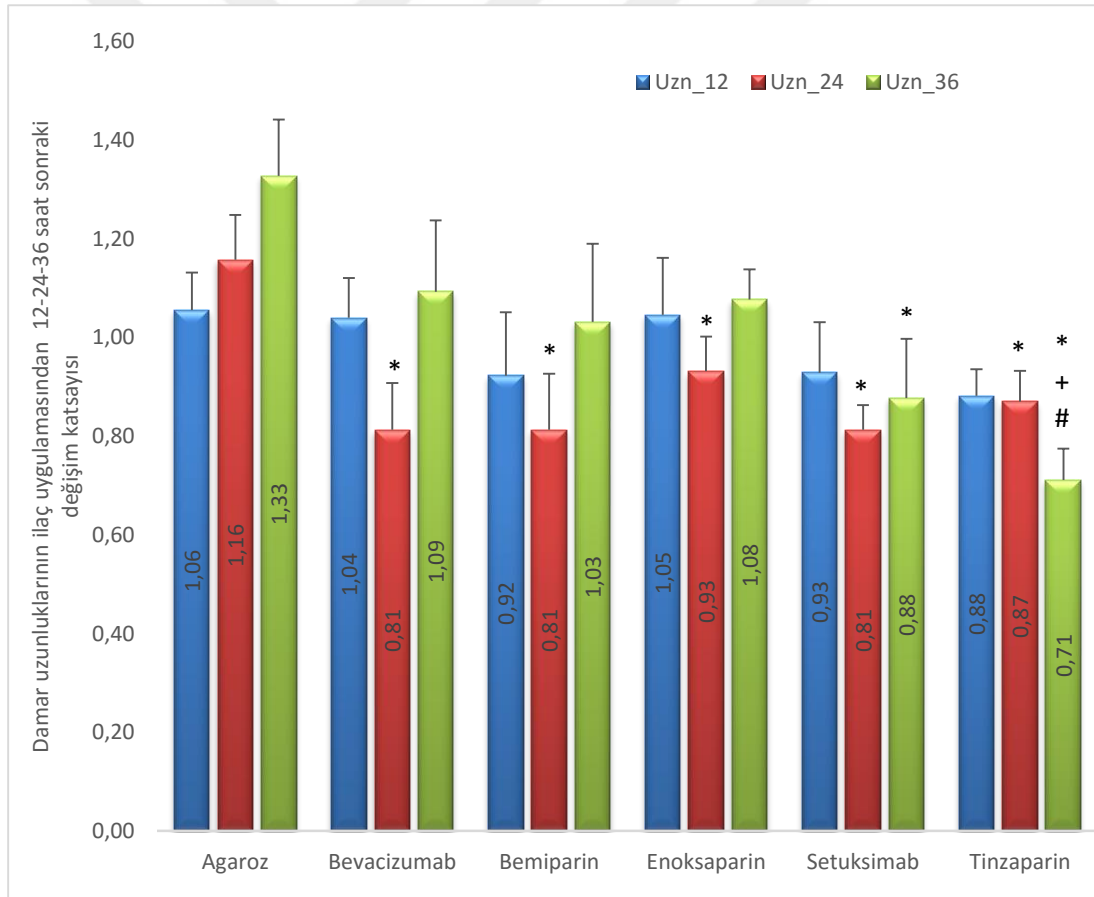
5.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS programı ile non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile gruplararası anlamlı bir farklılığın olup olmadığına bakıldı, gruplar arasındaki fark Mann-Whitney U testi ve $p < 0,05$ anlamlılığı ile değerlendirildi. Uygulanan testlerde ve grafiklerde ortalama değerler ve standart hatalar kullanılmıştır.

6. BULGULAR

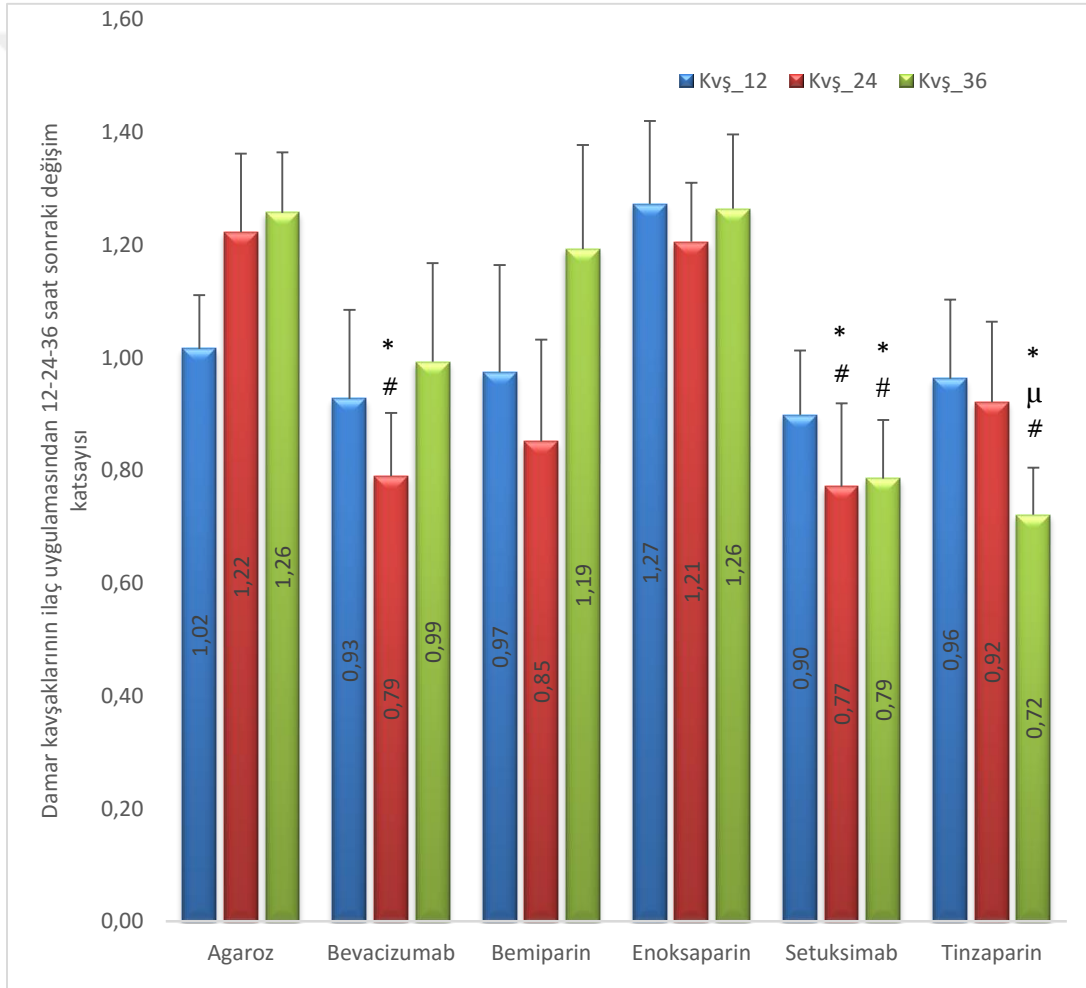
Bu çalışma agaroz, bevacizumab, setuksimab, bemiparin, enoksaparin ve tinzaparin olmak üzere altı gruptan oluşturulmuştur. Tüm grupların verileri yedi yumurtadan oluşacak şekilde grupların iki katı yumurta konulmuştur. Sonuç alınamayan yumurtalar embriyo gelişmemesi, sterilizasyon, uygulama esnasında kanama, ölçüm yapılamaması gibi nedenlerden dolayı değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Gruplar için antianjiyogenik etkileri değerlendirmek için otomatik analiz için Angioquant programı kullanılmıştır. Gruplara ait herbir yumurta örneği görüntülerinin damar uzunluk ve damar kavşaklarının ortalamaları ile kısa-orta-uzun (12-24-36 saat) dönem değişiklikler incelenmiştir.



Şekil 29. Otomatik ölçüm damar uzunluklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği. Grafikte ortalama değer $\pm$ SEM kullanılmıştır. * agaroz grubuna göre, + bevacizumab grubuna göre ve # enoksaparin grubuna göre $p < 0.05$ düzeyde farklılığı işaret etmektedir.

Damar uzunluk değişim otomatik analiz yönünden, ilaç uygulamasından 12 saat sonra gruplar arasında anlamlı fark bulunmaz iken 24 saat sonra bevacizumab $p=0.047$, bemiparin $p=0.041$, enoksaparin $p=0.055$, setuksimab $p=0.011$ ve tinzaparin $p=0.047$ ile agaroz karşı anlamlı farklılık göstermiştir. İlaç uygulamasından 36 saat sonra ise damar uzunluk yönünden setuksimab $p=0.025$ ve tinzaparin $p=0.003$ ile agaroz grubu karşılaştırması sonucu anlamlı farklılık göstermiştir. Ayrıca Tinzaparin damar uzunluk değişimi yönünden $p=0.041$ ile bevacizumab grubuna, $p=0.006$ ile de enoksaparin grubuna göre anlamlı farklılık göstermiştir (şekil 29).



şekil 30. Otomatik lm damar kavşaklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği. Grafikte ortalama değer $\pm$ SEM kullanılmıştır. * agaroz grubuna göre, μ bemiparin grubuna göre ve # enoksaparin grubuna göre $p<0.05$ düzeyde farklılığı işaret etmektedir.

Damar kavşak sayısı değişimi otomatik analiz yönünden, ilaç uygulamasından 12 saat sonra gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır. İlaç uygulamasından 24 saat sonra bevacizumab $p=0.029$ ve setuksimab $p=0.048$ ile agaroz grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Bir diğer karşılaştırma ise bevacizumab $p=0.018$ ve setuksimab $p=0.025$ ile enoksaparine oranla anlamlı farklılık göstermiştir. İlaç uygulamasından 36 saat sonra tinzaparin $p=0.013$ ile agaroz, $p=0.009$ ile enoksaparin ve $p=0.055$ ile de bemiparin oranla anlamlı farklılık göstermiştir. Ayrıca setuksimab 36 saat sonra $p=0.025$ ile agaroz ve $p=0.018$ ile de enoksaparine oranla anlamlı fark göstermiştir (Şekil 30).

Çalışmaya ait grup sayıları, ortalama değerler, standart sapmalar, standart hatalar, minimum ve maksimum değerler tablo 2, 3, 4, 5, 6 ve 7’ de sunulmuştur.

Tablo 2. Agaroz grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Agaroz	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.06	.20	.08	.86	1.34
Kavşak-12. saat	7	1.02	.25	.10	.71	1.36
Uzunluk-24. saat	7	1.16	.24	.09	.85	1.59
Kavşak-24. saat	7	1.22	.37	.14	.72	1.64
Uzunluk-36. saat	7	1.33	.31	.11	.94	1.67
Kavşak-36. saat	7	1.26	.28	.11	.93	1.61

Tablo 3. Bevacizumab grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Bevacizumab	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.04	.21	.08	.73	1.34
Kavşak-12. saat	7	.92	.42	.16	.54	1.73
Uzunluk-24. saat	7	.81	.25	.09	.59	1.16
Kavşak-24. saat	7	.79	.30	.11	.59	1.42
Uzunluk-36. saat	7	1.09	.38	.14	.59	1.67
Kavşak-36. saat	7	.99	.46	.17	.59	1.70

Tablo 4. Bemiparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Bemiparin	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	.92	.34	.13	.40	1.47
Kavşak-12. saat	7	.97	.50	.19	.46	1.81
Uzunluk-24. saat	7	.81	.30	.11	.37	1.29
Kavşak-24. saat	7	.85	.48	.18	.46	1.80
Uzunluk-36. saat	7	1.03	.42	.16	.33	1.52
Kavşak-36. saat	7	1.19	.49	.18	.61	1.75

Tablo 5. Enoksaparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

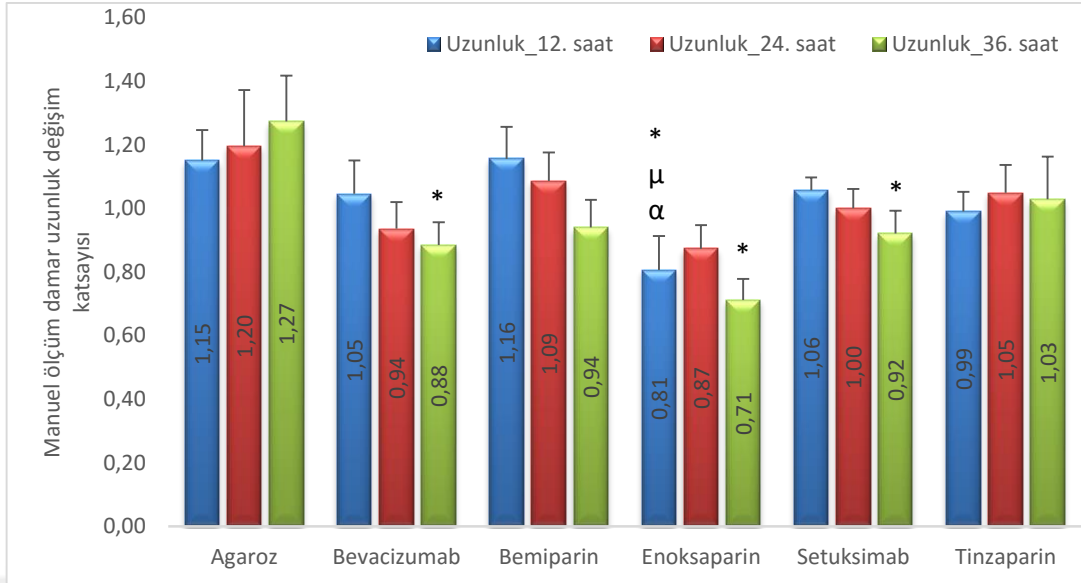
Enoksaparin	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.05	.31	.12	.46	1.36
Kavşak-12. saat	7	1.27	.39	.15	.66	1.69
Uzunluk-24. saat	7	.93	.19	.07	.72	1.27
Kavşak-24. saat	7	1.21	.28	.10	.81	1.60
Uzunluk-36. saat	7	1.08	.16	.06	.75	1.25
Kavşak-36. saat	7	1.26	.40	.13	.87	1.80

Tablo 6. Setuksimab grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Setuksimab	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	.93	.27	.10	.63	1.45
Kavşak-12. saat	7	.90	.30	.11	.47	1.42
Uzunluk-24. saat	7	.81	.13	.05	.65	1.04
Kavşak-24. saat	7	.77	.39	.15	.40	1.49
Uzunluk-36. saat	7	.88	.32	.12	.41	1.21
Kavşak-36. saat	7	.79	.27	.10	.40	1.11

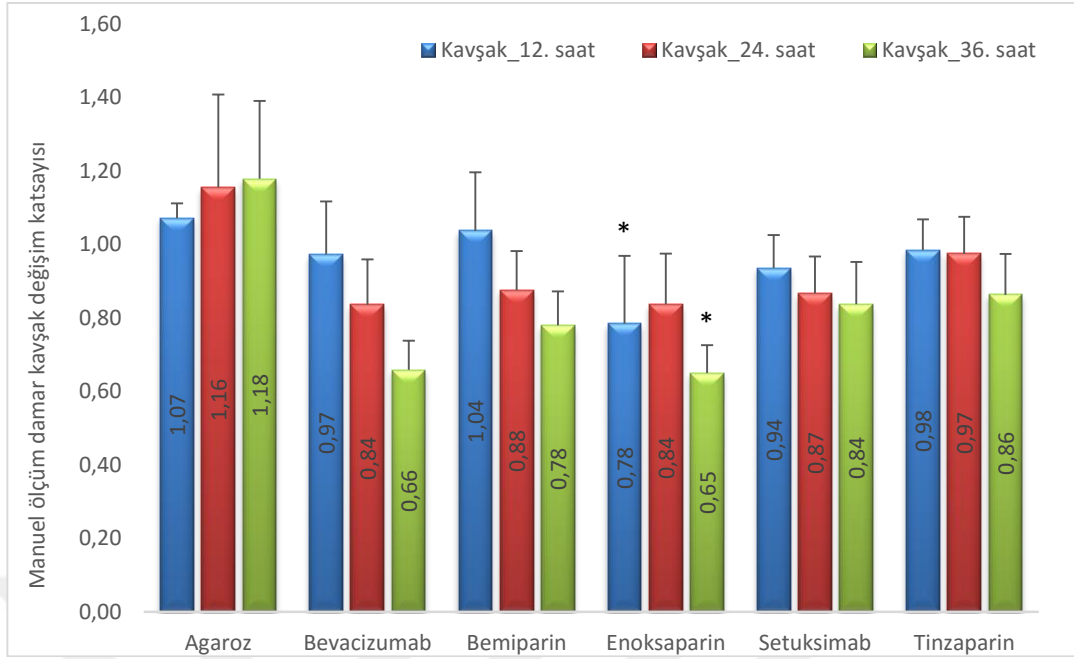
Tablo 7. Tinzaparin grubu otomatik ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Tinzaparin	N	Ortalama	SD	SEM	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	.88	.14	.05	.70	1.06
Kavşak-12. saat	7	.96	.37	.14	.50	1.63
Uzunluk-24. saat	7	.87	.16	.06	.70	1.10
Kavşak-24. saat	7	.92	.38	.14	.45	1.42
Uzunluk-36. saat	7	.71	.17	.06	.51	1.00
Kavşak-36. saat	7	.72	.22	.08	.49	1.05



Şekil 31. Manuel ölçüm damar uzunluklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği. Grafikte ortalama değer $\pm$ SEM kullanılmıştır. * agaroz grubuna göre, μ bemiparin grubuna göre ve α setuksimab grubuna göre $p < 0.05$ düzeyde farklılığı işaret etmektedir.

Damar uzunluk değişim manuel analiz yönünden, ilaç uygulamasından 12 saat sonra grup karşılaştırmasında sadece enoksaparin grubunun agarozla $p=0.029$, bemiparine $p=0.035$ ve setuksimaba $p=0.047$ ile anlamlı fark gösterirken diğer gruplarda bir fark bulunmamıştır. 24 saat sonra ise hiçbir grup karşılaştırmasında anlamlı fark bulunmamıştır. İlaç uygulamasından 36 saat sonra ise damar uzunluk yönünden bevacizumab $p=0.015$, setuksimab $p=0.035$ ve enoksaparin $p=0.002$ ile agaroz grubu ile karşılaştırılması sonucu anlamlı farklılık göstermiştir (Şekil 31).



Şekil 32. Manuel ölçüm damar kavşaklarının kısa-orta-uzun (12-24-36. saat) dönemde değişim katsayılarının grafiği. Grafikte ortalama değer $\pm$ SEM kullanılmıştır. * agaroz grubuna göre $p < 0.05$ düzeyde farklılığı işaret etmektedir.

Damar kavşak değişim manuel analiz yönünden, ilaç uygulamasından 12 saat sonra grupların karşılaştırmasında sadece enoksaparin $p=0.025$ ile agaroz grubuna göre anlamlı fark göstermiş diğer gruplarda anlamlı fark bulunmamıştır. 24 saat sonra ise hiçbir grupta anlamlı fark bulunmamıştır. İlaç uygulamasından 36 saat sonra ise damar kavşak yönünden yine sadece enoksaparin $p=0.04$ ile agaroz grubuna karşı çok az anlamlı farklılık göstermiştir (Şekil 32). Gruplara ait manuel ölçüm verileri Tablo 8-13'de sunulmuştur.

Tablo 8. Agaroz grubuna ait manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Agaroz	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.15	.10	.25	.86	1.57
Kavşak-12. saat	7	1.07	.04	.11	.95	1.25
Uzunluk-24. saat	7	1.20	.18	.47	.86	2.22
Kavşak-24. saat	7	1.16	.25	.67	.64	2.60
Uzunluk-36. saat	7	1.27	.14	.38	.92	2.05
Kavşak-36. saat	7	1.18	.21	.56	.68	1.98

Tablo 9. Bevacizumab grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Bevacizumab	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.05	.10	.28	.64	1.40
Kavşak-12. saat	7	.97	.14	.38	.48	1.44
Uzunluk-24. saat	7	.94	.08	.22	.58	1.23
Kavşak-24. saat	7	.84	.12	.33	.37	1.26
Uzunluk-36. saat	7	.88	.07	.19	.57	1.15
Kavşak-36. saat	7	.66	.08	.21	.31	.90

Tablo 10. Bemiparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Bemiparin	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.16	.10	.27	.81	1.69
Kavşak-12. saat	7	1.04	.16	.42	.62	1.67
Uzunluk-24. saat	7	1.09	.09	.24	.73	1.45
Kavşak-24. saat	7	.88	.11	.28	.56	1.36
Uzunluk-36. saat	7	.94	.09	.23	.64	1.28
Kavşak-36. saat	7	.78	.09	.24	.49	1.27

Tablo 11. Enoksaparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Enoksaparin	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	.81	.11	.28	.41	1.33
Kavşak-12. saat	7	.78	.18	.49	.26	1.81
Uzunluk-24. saat	7	.87	.07	.20	.71	1.25
Kavşak-24. saat	7	.84	.14	.36	.49	1.60
Uzunluk-36. saat	7	.71	.07	.18	.42	.91
Kavşak-36. saat	7	.65	.08	.20	.33	.99

Tablo 12. Setuksimab grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Setuksimab	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	1.06	.04	.11	.85	1.20
Kavşak-12. saat	7	.94	.09	.24	.62	1.33
Uzunluk-24. saat	7	1.00	.06	.16	.76	1.17
Kavşak-24. saat	7	.87	.10	.26	.52	1.21
Uzunluk-36. saat	7	.92	.07	.19	.73	1.20
Kavşak-36. saat	7	.84	.11	.30	.49	1.35

Tablo 13. Tinzaparin grubu manuel ölçüm damar ve kaşak değişim katsayı verileri

Tinzaparin	N	Ortalama	SEM	SD	Minimum	Maksimum
Uzunluk-12. saat	7	.99	.06	.16	.80	1.27
Kavşak-12. saat	7	.98	.08	.22	.67	1.30
Uzunluk-24. saat	7	1.05	.09	.23	.80	1.46
Kavşak-24. saat	7	.97	.10	.27	.71	1.46
Uzunluk-36. saat	7	1.03	.13	.36	.57	1.53
Kavşak-36. saat	7	.86	.11	.29	.48	1.28

7. TARTIŞMA

Anjiyogenezin başlatıcısı olarak pek çok faktör bulunmaktadır bunlar; FGF, VEGF, TGF, PDGF, TNF-alfa, interlökinler, kemokinler ve anjiyopoetinler olarak sıralanabilir (3). Antianjiyogenez alanında yapılan çalışmalarda kullanılan ürünlerin anjiyogenezi inhibe etme potansiyelleri araştırılmıştır ve araştırılmayada devam edilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı heparinlerin kanserli hastalarda tromboembolik komplikasyonları önlemede efektif olduğu bilinmektedir. Zacharski ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DMAH kullanımının, kanser progresyonunu geciktirmede ve sağ kalım üzerinde olumlu yönde etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (165). DMAH'lerin antitümör etkilerinin potansiyel mekanizmaları Mousa ve Mohamed tarafından yapılan bir çalışma ile (a) anti FXa ve antitrombin fonksiyonları, (b) endotelial hücrelerden DFYİ nin salınımı ve (c) matriks bozucu enzimlerin inhibisyonu sağlayarak gösterdikleri ifade edilmektedir (167). Bu çalışmada anti- Xa veya anti- IIa aktivitesine sahip olmayan non-antikoagülan düşük molekül ağırlıklı heparin (NA-LMWA) enoksaparin ile karşılaştırılmış ve *in vitro* insan endotelial hücrelerinden DFYİ salgılamayı tetiklemede benzer etkiye sahip oldukları sonucuna ulaşmışlardır. Benzer sonuçlar B16 melanoma fare modelinde yapılan çalışmada, günlük enoksaparinin ve NA-LMWH nin 10 mg/kg dozlarını 14 gün takiben pretümör hücresi enjeksiyonu ile deneysel akciğer metastazını %70 kadar azalttığını göstermişlerdir (166). Mousa ve Mohamed tarafından yapılan başka bir çalışmada tümör implant yöntemi ile tinzaparin ve rekombinant DFYİ'nin kolon karsinomu, insan fibrosarkomu ve akciğer karsinomunun büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (167). Bir başka çalışmada B16 melanom metastaz fare modelinde ciltaltı tinzaparin uygulamasının akciğer metastazını ve tümörle ilişkili koagülopatiyi önlediği gösterilmiştir (152). Mousa tarafından yapılan başka bir çalışmada CAM modeli ile DMAH'lerin antianjiyogenik etkisini VEGF ve bFGF inhibisyonu üzerinden etkili olduğu rapor edilmiştir (168).

Sunulan bu çalışmada CAM yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada tercih edilen moleküllerden bevacizumab ve setuksimab daha önce yapılan çalışmalar dikkate alınarak bevacizumab 0.125 mg/10 µl olarak (169-171), setuksimab 0.035 mg/10 µl kullanılmıştır (172). Bevacizumab antianjiyogenik etkisini VEGF inhibisyonu gerçekleştirerek yapar, setuksimab EGF inhibisyonu üzerinden EGF'nin anjiyogenik sitokinlerin salınımını inhibe ederek antianjiyogenik etkinlik göstermektedir (173).

Shaheen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada setuksimab ve bevacuzimabın tümör anjiyogenez karşılaştırmasında tek başlarına kullanımında bevacizumabın daha etkin olduğunu göstermiştir (174). Bhuvaneswari ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise iki ajanın aynı tedavide kullanılmaları tümör anjiyogenezini önlemede daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir (175). Bemiparin, enoksaparin ve tinzaparin literatür bilgileri ışığında 50 İÜ/10 µl kullanılmıştır (171, 176). DMAH'ler ile Doğan ve arkadaşların yapmış olduğu çalışma (176) sonuçlar ile Katrancıoğlu ve arkadaşlarının bulmuş olduğu (171) ortalama antianjiyogenik etkinlik benzer dozlarda benzer ürünlerde aynı bulunmuştur. Katrancıoğlu yapmış olduğu çalışmada (171) standart heparinin her iki DMAH grubundan anlamlı olarak daha etkin olduğu bulunmuştur. Marchetti ve arkadaşlarının yaptıkları tümör hücre kültüründe, heparin, enoksaparin, daltaparin antianjiyogenik etkinlik araştırmasında 0.01, 0.1 ve 1 İÜ/ml dozlarında her iki DMAH grubu heparine göre daha anlamlı ve etkili olduğu iddia edilmişlerdir (144).

Bizim yaptığımız çalışmada uygulanan moleküllerin kısa-orta-uzun dönemlerde antianjiyogenik etkinlikleri otomatik ve manuel analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

Otomatik analiz ile damar uzunlukları yönünden hem büyüme faktörü inhibitörlerinin hemde DMAH'lerin kısa dönemde (ilaç uygulamasından 12 saat sonra) anlamlı bir etkilerinin olmadığı, anlamlı etkinin orta dönemde (ilaç uygulamasından 24 saat sonra) başladığını göstermiştir. Uzun dönemde ise (ilaç uygulamasından 36 saat sonra) büyüme faktörlerinden EGF inhibitörü setuksimab ve DMAH'lerden molekül ağırlığı yüksek olan tinzaparinde etkinin devam ettiği görülmüştür. Damar kavşaklarında azalma yönünde kısa dönemde hiçbir grupta anlamlı bir azalma görülmemiştir. İlaç uygulama sonrası orta dönemde sadece büyüme faktörlerinin damar kavşakları oluşturmada anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. İlaç uygulama uzun dönemi 36. saat de ise büyüme faktörlerinden setuksimab ve DMAH'lerden tinzaparin grubunda damar kavşakları oluşturmada anlamlı bir azalmanın olduğu bulunmuştur.

Manuel analiz ile ise, damar uzunluk yönünden kısa dönemde sadece enoksaparin grubunda etkinlik görülürken orta dönemde hiçbir grupta bir etki görülmemiş fakat uzun dönem ise VEGF inhibitörü bevacizumab, EGF inhibitörü setuksimab ve DMAH grubundan enoksaparin grubunda etkinlik görülmüştür. Damar kavşak değişimi yönünden ise sadece enoksaparin grubunda kısa ve uzun dönemde etkinlik görülmüştür.

Çalışmada antianjiyogenik etki analizi hem otomatik programla hem de yarı manuel olarak yapılmıştır, sonuçlar bir birine benzer olmakla beraber, az da olsa farklılık göstermiştir. Her iki yöntemin karşılaştırmasında otomatik analiz programının standart hatasının yüksek bulunması, manual analiz sonuçlarının ise daha düşük bulunması manuel ölçüm sonuçlarının dikkate alınması seçeneğini düşündürülebilir. Ancak her iki yöntemin verileri temelde zaman aralığı, damar uzunluğu ve damar kavşakları ve de ilaç karakterlerine göre birbirine benzer görünmektedir. Büyüme faktörleri inhibitörleri antianjiyogenik etki açısından birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Düşük molekül ağırlıklı heparinler de antianjiyogenik etkinlik açısından zaman aralığı, damar uzunluğu ve kavşakları açısından benzerlik göstermekte ancak, angioquant (otomatik ölçüm) programı ölçümü tinzaparin grubunu, manual ölçüm ise enoksaparin grubunun daha etkili olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olarak tercih edilen damar oluşumu inhibitörleri büyüme faktörleri ile kıyaslandığında, değerlendirme programlarına göre DMAH'lerin kullanılan dozlarda, CAM yönteminde antianjiyogenik etki gösterdiği kabul edilmiştir.

Çalışmanın amacı olan CAM yöntemi araştırmasına göre deneyde kullanılan her üç DMAH'nin antianjiyogenik etkisinin var olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacının gözüyle seçebildiği ve işaretleyebildiği damar ve damar kavşaklarının sayımı ayrıca emek harcanması açısından değerlidir. Bu çalışmanın sonuçları bir ön fikir oluşturmaları açısından değerli kabul edilebilir. Ancak DMAH'lerin antianjiyogenik etki açısından değerlendirilmesinde farklı yöntemler ile daha pek çok *in vitro* ve *in vivo* prelinik ve de klinik çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan bu çalışmada farklı molekül ağırlıklara sahip DMAH'ler klinikte antianjiyogenik ajan olarak kullanılan büyüme faktörleri inhibitörleri ile karşılaştırma yaparak DMAH'lerin antianjiyogenik etkilerinin olup olmadığına ve molekül ağırlıklarının kısa-orta-uzun dönemde antianjiyogenik etkinliğinin nasıl olduğu civciv koryoallantoik membran modelinde araştırıldı. Bu araştırmaya göre;

1. DMAH'lerin antianjiyogenik etkinliğinin olabildiği,
2. Antianjiyogenik etkinin molekül ağırlığı ile direkt bir bağlantısının bulunamadığına,
3. CAM modelinde antianjiyogenik etkinliğin ilaç uygulamasından 36 saat sonra araştırılmasının daha doğru olabileceğine,
4. CAM modelinde damar görüntü analizlerin otomatik analizden ziyade manuel analizlerin kullanımının daha sağlıklı sonuçlar vereceği sonucuna ulaşılabilir.

Bu sonuçlar doğrultusunda; DMAH'lerin normal fizyolojik anjiyogenezi önlemedeki antianjiyogenik etkinliklerinin 50 İÜ/10 µl lik dozlarda var olduğu söylenebilir. Fakat tümör anjiyogenezi önlemede etkilerinin araştırılıp değerlendirilmesi için CAM tümör implant yöntemleriyle de araştırılması klinik çalışmalar için preklinik destek sağlayabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Smorenburg SM, Van Noorden CJ (2005). The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev* 53: 93-105.
2. Costa C, Soares R, Schmitt F (2004). Angiogenesis: now and then. *APMIS* 112: 402-412.
3. Ribatti D, Vacca A, Presta M (2002). The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 35: 227-231.
4. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncall L, Burri PH, Djonov V (2001). Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. *Anat Rec* 264: 317-324.
5. Vallee BL, Riordan JF, Lobb RR, et al (1985). Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker 256 carcinoma: an experimental investigation and review. *Experientia* 41: 1-15.
6. Norrby K (2006). Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS* 114: 79-102.
7. Prior BM, Yang HT, Terjung RL (2004). What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 97: 1119-1128.
8. Steven Seaman, Janine Stevens, Mi Young Yang, Daniel Logsdon, Cari Graff-Cherry, Brad St. Croix (2011) Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 11: 539-554.
9. Tanne JH (2011). FDA cancels approval for bevacizumab in advanced breast cancer. *BMJ* 343: 7684.
10. Dibiase MD, Rhodes CT (1991). The design of analytical methods for use in topical epidermal growth factor product development. *J Pharm Pharmacol* 43: 553-558.
11. Erbaş D (1990). Epidermal growth factor. *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1:30-34.

12. Memişoğlu E, Öner F, Ayhan A, Başaran L, Kaş HS, Hıncal AA (1996). Wound healing effectiveness of chitosan gel preparations with and without EGF in rabbit model. Proceed. 8th Inter. Pharm Technol Symp (IPTS). Sept. 9-11, 1996, Ankara, TÜRKİYE.
13. Miller CA, Debas HT (1995). Epidermal growth factor stimulates the restitution of rat gastric mucosa in vitro. *Exp Physiol* 80: 1009-1018.
14. Ciardiello F, Tortora G (2002). Antiepidermal growth factor receptor drugs in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 11:755-68.
15. Harari PM (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11: 689-708.
16. Lynch TJ, Kim ES, Eaby B, Garey J, West DP, Lacouture ME (2007). Epidermal growth factor receptor inhibitor-associated cutaneous toxicities: An evolving paradigm in clinical management. *The Oncologist* 12: 610-21.
17. Cowen EW (2007). Epidermal growth factor receptor inhibitors: A new era of drug reactions in a new era of cancer therapy. *J Am Acad Dermatol* 56: 514-517.
18. Li T, Perez-Soler R (2009). Skin toxicities associated with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Targ Oncol* 4: 107-19.
19. Gridelli C, Maione P, Amoroso D, Baldari M, Bearz A, Bettoli V, Cammilluzzi E, Crinò L, De Marinis F, Di Pietro FA, Grossi F, Innocenzi D, Micali G, Piantedosi FV, Scartozzi M (2008). Clinical significance and treatment of skin rash from erlotinib in non-small cell lung cancer patients: Results of an Experts Panel Meeting. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 155-62.
20. Segalier S, Van Cutsem E (2005). Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol* 16: 1425-33.

21. Manning HC, Merchant NB, Foutch AC, Virostko JM, Wyatt SK, Shah C, McKinley ET, Xie J, Mutic NJ, Washington MK, LaFleur B, Tantawy MN, Peterson TE, Ansari MS, Baldwin RM, Rothenberg ML, Bornhop DJ, Gore JC, Coffey RJ (2008). Molecular imaging of therapeutic response to epidermal growth factor receptor blockade in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14: 7413-7422.
22. Abulrob A, Lu Z, Baumann E, Vobornik D, Taylor R, Stanimirovic D, Johnston LJ (2010). Nanoscale imaging of epidermal growth factor receptor clustering: effects of inhibitors. *J Biol Chem* 285: 3145-3156.
23. Sunada H, Magun BE, Mendelsohn J, MacLeod CL (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3825-3829.
24. Wang YN, Lee HH, Lee HJ, Du Y, Yamaguchi H, Hung MC (2012). Membrane-bound trafficking regulates nuclear transport of integral epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB-2. *J Biol Chem* 287: 16869-16879.
25. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK (2002). Platelets and cancer. *Lancet Oncol* 3: 425-430.
26. Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Büller HR, Reitsma PH, Richel DJ (2007). Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol* 61: 195-207.
27. Smorenburg SM, Van Noorden CJ (2001). The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev* 53: 93-105.
28. Mousa SA, Mohamed S (2004). Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol Rep* 12: 683-688.

29. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA and Shima DT (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5: 495-502.
30. Ferrara N, Alitalo K (1999). Clinical Applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364.
31. Folkman J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
32. Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
33. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H and Folkman J (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348: 555-557.
34. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH and Folkman J (1994). Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328.
35. Griffioen AW, Molema G (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-268.
36. Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, Koivunen E, Pasqualini R, Ruoslahti E (1998). Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display. *J Clin Invest* 102: 430-437.
37. Verstraete M (1995). Endothelial cell-mediated coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. The endothelial cell in health and disease (Ed: Vane JR, Born GVR and Welzel D). New York, 147-164.
38. Carlos TM, Harlan JM (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.

39. Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.
40. Denekamp J (1984). Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* 23: 217-225.
41. Jin SW, Patterson C (2009). The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arterioscler Thromb Vasc Bol* 29: 623-629.
42. Ash JD, Overbeek PA (2000). Lens-specific VEGF-A expression induces angioblast migration and proliferation and stimulates angiogenic remodeling. *Developmental Biology* 223: 383-398.
43. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, Nakamura K, Morikawa S, Tanaka S, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M (2005). Vascular endothelial growth factor A(VEGF-A) is involved in guidance of VEGF receptor-positive cells to the anterior portion of early embryos. *Mol Cell Biol* 25: 355-363.
44. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB* 20: 1495-1497.
45. Stegmann TJ (1998). FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 7: 2011-2015.
46. Khurana R, Simons M (2003). Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease. *Trends Cardiovasc Med* 13: 116-122.
47. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Ernst H (1995). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7: 933-937.
48. Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, Wartenberg M, Marti HH, Bauer C, Wenger RH, Acker H.(1996). Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2867-2872.

49. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Adelman DM, Gohil M, Simon MC (2006). HIF-dependent hematopoietic factors regulate the development of the embryonic vasculature. *Dev Cell* 11: 81-92.
50. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. (2003). Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Cir Res* 93: 664-673.
51. Schmidt A, Brixius K, Bloch W (2007). Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Cir Res* 101: 125-136.
52. le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Breant C, Fleury V, Eichmann A (2004). Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 131: 361-375.
53. Lucitti JL, Jones EA, Huang C, Chen J, Fraser SE, Dickinson ME (2007). Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development* 134: 3317-3326.
54. Roy S, Khanna S, Sen CK (2008). Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic Biol Med* 44: 180-192.
55. Arbiser JL, Petros J, Klafter R, McLaughlin ER, Brown LF, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold RS, Lambeth JD (2002). Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:715-720.
56. Sen CK, Packer L (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10: 709-720.
57. Ushio-Fukai M, Urao N (2009). Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal* 11: 2517-2533.
58. Sauer H, Bekhite MM, Hescheler J, Wartenberg M (2005). Redox control of angiogenic factors and CD31-positive vessel-like structures in mouse embryonic stem cells after direct current electrical field stimulation. *Exp Cell Res* 304: 380-390.

59. Huang SS, Zheng RL (2006). Biphasic regulation of angiogenesis by reactive oxygen species. *Pharmazie* 61: 223-229.
60. Cohen S (1983). The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 51: 1787-1791.
61. Cohen S(1965). The stimulation of epidermal proliferaton by a spesific protein (EGF). *Dev Biol* 12: 394-407.
62. Byyny RL, Orth DN, Cohen S (1972). Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endo* 90: 1261-1266.
63. Carpenter G, Cohen S (1979). Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 68: 194-216.
64. Gregory H (1975). Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 257: 325-327.
65. Hu JC, Sadeghi P, Pinter-Brown LC, Yashar S, Chiu MW (2007). Cutaneous side effects of epidermal growth factor receptor inhibitors: Clinical presentation, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol* 56: 317-26.
66. Caponigro F, Formata R, Caraglia M, Normanno N, Iaffaioli RV (2005). Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors. *Cur Opin Oncol* 17: 212-217.
67. Waaler BA (1957). Simultaneous contrubution to the formation of trombin by the intrinsic and extrinsic blood clotting systems. *Scand J Clin Lab Invest* 9: 322-330.
68. MacFalane RG (1964). An enzyme cascade in blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature* 202: 498-499.
69. Davie EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 145: 1310-1312.
70. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. An empirical study. *J Biol Chem* 269: 23357-23366.
71. Rand MD, Lock JB, van't Veer C, Gaffney DP, Mann KG (1996). Blood clotting in minimally altered whole blood. *Blood* 88: 3432-3445.

72. Broze GJ, Warren LA, Nonotny WF (1988). The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits the factor VII-tissue factor complex also inhibits factor Xa: insight into its possible mechanism of action. *Blood* 71: 335-343.
73. Luan D, Szlam F, Tanaka KA, Barie PS, Varner JD (2010). Ensembles of uncertain mathematical models can identify network response to therapeutic interventions. *Mol Biosys* 6: 2272-2286.
74. Koster T, Rosendaal RF, Briet E (1995). Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis. *Blood* 85: 2756-2761.
75. Allaart CF, Poort SR, Rosendaal RF (1993). Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficient defect. *Lancet* 341: 134-138.
76. Thaler E, Lechner K (1981). Antithrombin III deficiency and thromboembolism. *Clin Hematol* 10: 369-390.
77. Van't Veer C, Mann KG (1997). Regulation of tissue factor initiated thrombin generation by the stoichiometric inhibitors tissue factor pathway inhibitor, antithrombin-III and heparin cofactor-II. *J Biol Chem* 272: 4367-4377.
78. Bach RR (1988). Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 23: 339-368.
79. Petersen LC, Valentin S, Hedner U (1995). Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Res* 79: 1-47.
80. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC (1993). Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 81: 734-744.
81. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N (1990). Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 59: 421-437.

82. Drake TA, Morrissey JH, Edgigton TS (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and trombosis. *Am J Pathol* 134: 1087-1097.
83. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2839-2843.
84. Camerer E, Kolsto AB, Prydz H (1996). Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81: 1-41.
85. Osterud B (1998). Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 9: 9-14.
86. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Giesen P, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y (1997). Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemos* 78: 200-204.
87. Rickles FR, Hair GA, Zeff RA, Lee E, Bona RD.(1995). Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells. *Thromb Haemos* 74: 391-395.
88. Robson SC, Schulte AE, Bach FH (1999). Factors in xenograft rejection. *Ann N Y Acad Sci* 875: 261-276.
89. McVey JH (1999). Tissue Factor pathway. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12: 361-372.
90. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgigton TS (1989). Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J cell Biol* 109: 389-395.
91. St Pierre J, Yang LY, Tamirisia K, Scherrer D, De Ciechi P, Eisenberg P (1999). Tissue factor pathway inhibitor attenuates procoagulant activity and upregulation of tissue factor at the site of balloon induced arterial injury in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2263-2268.

92. Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI (1985). Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X an additional plasma component. *Blood* 66: 204-212.
93. Bajaj MS, Birktoft JJ, Ster SA, Bajaj SP (2001). Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 86: 959-972.
94. Broze GJ Jr, Girard TJ (2012). Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci* 17: 262-280.
95. Broze Jr GJ, Warren LA, Novotny WF, Higuchi DA, Miletich JP (1998). The lipoprotein-associated coagulation inhibitor that inhibits factor VII-tissue factor complex also inhibits the factor Xa: in sight into its possible mechanism of action. *Blood* 71: 335-343.
96. Broze Jr GJ, Warren LA, Novotny WF (1990). Regulation of coagulation by a multivalent Kuntz -type inhibitor. *Biochemistry* 29: 539-7546.
97. Rao LV, Rapaport SI (1987) Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood* 69: 645-651.
98. Novotny WF, Brown SG, Miletich JP, Rader DJ, Broze Jr GJ (1991). Plasma antigen levels of the lipoprotein associated coagulation inhibitor in patient samples. *Blood* 78: 387-393.
99. Lesnik P, Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ (1993). Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Atheroscler Thromb* 13: 1066-1075.
100. Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ (1989). Purification and characterizasyon of the lipoprotein associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem* 264: 18832-18837.
101. Broze Jr GJ, Lange GW, Duffin KL, MacPhail L (1994). Heterogenity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coag Fibrinol* 5: 551-559.
102. Novotny WF (1994). Tissue factor pathway inhibitor. *Sem Thromb Hemost* 20: 101-108.

103. Sandset PM, Larsen ML, Lindahl AK, Abildgaard U, Odegaard OR (1991). Chromogenic substrate assay extrinsic pathway inhibitor: levels in the normal population and relation to cholesterol. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2: 425-433.
104. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Saito H, Spitzer SG, Bajaj SP (1990). Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: Evidence that endothelium is principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8869-8873.
105. Bajaj MS, Kuppuswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP (1999). Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost* 82: 1047-52.
106. Shimokawa T, Yamamoto K, Kojima T, Saito H (2000). Down regulation of urine tissue factor inhibitor mRNA by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha *in vitro* and *in vivo*. *Thromb Res* 100: 211-221.
107. Edstrom CS, Calhoun DA, Christensen RD (2000). Expression of tissue factor pathway inhibitor in human fetal and placentar tissues. *Early Hum Dev* 59: 77-84.
108. Ameri A, Kuppuswamy MN, Basu S, Bajaj SP (1992). Expression tissue factor pathway inhibitor by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators. *Blood* 79: 3219-3226.
109. Broze GJ Jr, Lange GW, Duffin KL, Macphail L (1994). Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5: 552-559.
110. Sandset PM, Abildgaard U, Larsen ML (1998). Heparin induces release of extrinsic coagulation pathway inhibitor (EPI). *Thromb Res* 50: 803-813.
111. Harris GM, Stendtl CL, Vollenhoven BJ, Gan TE, Tipping PG (1999). Decreased plasma plasma tissue factor pathway inhibitor in woman taking combined oral contraceptives. *Am J Hematol* 60: 175-180.
112. Sakkinen PA, Cushman M, Psaty BM, Kuller LH, Bajaj SP, Sabharwal AK (1998). Correlates of antithrombin III, protein C, protein S and TFPI in a healthy elderly cohort. *Thromb Haemost* 80: 134-139.

113. Fernandez PM, Rickles FR (2002). Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 9: 401-406.
114. Sack GH, Levin J, Bell WR (1977). Trousseau's syndrome and other manifestations of chronic disseminated coagulopathy in patients with neoplasm: clinical, pathophysiologic, and therapeutic features. *Medicine* 56: 1-37.
115. Bell WR, Starksen NF, Tong S, Porterfield JK (1985). Trousseau's syndrome: Devasting coagulopathy in the absence of heparin. *Am J Med* 79: 423-430.
116. Szczepanski M, Bardadin K, Zawatzki J, Pypno W (1988). Procoagulant activity of gastric, colorectal, and renal cancer factor VII-dependent. *J Cancer Res Clin Oncol* 114: 519-522.
117. Rao LV (1992). Tissue factor as a tumor procoagulant. *Cancer Metastasis Rev* 11: 249-266.
118. Rickles FR, Levine MN, Dvorak HF (2001). Abnormalities in hemostasis in malignancy. *Hemostasis and Thrombosis* (Ed. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1131-1152.
119. Lorenzet R, Donati MB (2002). Blood clotting activation, angiogenesis and tumor metastasis: Any role for TFPI? *Thromb Haemost* 87: 928-929.
120. Constantini V, Zacharski LR (1993). Fibrin and cancer. *Thromb Haemost* 69: 406-414.
121. Dvorok HF (1986). Tumors: Wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315: 1650-1659.
122. Brown LF, Van de Water L, Harvey VS, Dvorak HF (1988). Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. *Am J Pathol* 130: 455-465.
123. Dvorok HF, Harvey VS, McDonagh J (1984). Quantitation of fibrinogen in flux and fibrin deposition and turnover in line 1 and line 10 guinea pig carcinomas. *Cancer Res* 44: 3348-3354.

124. Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL (1996). Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87: 709-715.
125. Iversen N, Lindahl AK, Abildgaard U (1998). Elevated TFPI in malignant disease: relation to cancer type and hypercoagulation. *Br J Haematol* 102: 889-895.
126. Lindahl AK, Odegaard OR, Sandset PAL, Harbitz TB (1992). Coagulation inhibition and activation in pancreatic cancer. *Cancer* 70: 2067-2072.
127. Lindahl AK, Sandset PAL, Abildgaard U, Anderson TR, Harbitz TB (1989). High levels extrinsic pathway inhibitor and low levels of other coagulation inhibitors in advanced malignant disease. *Acta Chir Scand* 155: 389-393.
128. Donati MB (1995). Cancer and thrombosis: from phlegmasia alba dolens to transgenic mice. *Thromb Haemost* 74: 278-281.
129. Ameri A, Kuppuswamy MN, Basu S, Bajaj SP (1992). Expression of TFPI by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators. *Blood* 79: 3219-3226.
130. Rickles F, Shoji M, Abe K (2001) The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol* 73: 145–150.
131. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM (2003). Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest* 124: 58-68.
132. Grande C, Caparro M (2005). Use of Low-Molecular-Weight Heparins in the Treatment and Secondary Prevention of Cancer-Associated Thrombosis. *Semin Oncol Nurs* 21: 41-49.
133. Kakkar AK (2004). Low- and ultra-low-molecular-weight heparins. *Best Pract Res Clin Haematol* 17: 77-87.

134. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE (2001). Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 119: 64-94.
135. Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW (2003). Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2110-2115.
136. Akl EA, Rohilla S, Barba M, Sperati F, Terrenato I, Muti P, Bdair F, Schünemann HJ (2008). Anticoagulation for the initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review. *Cancer* 113: 1685-1694.
137. Kwaan HC, Green D, Pineo, GF, Hull RD (2009). Effects of Anticoagulants on Cancer: Heparins. *Coagulation in Cancer* (Rosen ST, ed.). Springer US 259-275.
138. Mousa SA, Petersen LJ (2009). Anti-cancer properties of low-molecular weight heparin: Preclinical evidence. *Thromb Haemost* 102: 258-267.
139. Sideras K, Schaefer PL, Okuno SH, Sloan JA, Kutteh L, Fitch TR, Dakhil SR, Levitt R, Alberts SR, Morton RF, Rowland KM, Novotny P, Loprinzi CL (2006). Low-molecular-weight heparin in patients with advanced cancer: A phase 3 clinical trial. *Mayo Clin Proc* 81: 758-767.
140. Thodiyil P, Kakkar AK (2002). Can low-molecular-weight heparins improve outcome in patients with cancer? *Cancer Treat Rev* 28: 151-155.
141. Robert F (2010). The potential benefits of low-molecular-weight heparins in cancer patients. *J Hematol Oncol* 3: 1-12.
142. Carlos F. Sa´nchez-Ferrer (2010). Bemiparin: pharmacological profile. *Drugs* 70: 19-23.
143. Shaker A. Mousa (2002). The Low Molecular Weight Heparin, Tinzaparin, in Thrombosis and Beyond. *Cardiovasc Drug Rev* 20: 199–216.

144. Marchetti, M, Vignoli A, Russo L, Balducci D, Pagnoncelli M, Barbui T, Falanga A (2008). Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. *Thromb Res* 121: 637-645.
145. Bobek V, Kovarik J (2004). Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother* 58: 213-219.
146. Borsig L (2010). Antimetastatic activities of heparins and modified heparins. Experimental evidence. *Thromb Res* 125:66-71.
147. Debergh I, Van Damme N, Pattyn P, Peeters M, Ceelen WP (2010). The low molecular-weight heparin, nadroparin, inhibits tumour angiogenesis in a rodent dorsal skin fold chamber model. *Br J Cancer* 102: 837-843.
148. Gasowska K, Naumnik B, Klejna K, Mysliwiec M (2009). The influence of unfractionated and low-molecular weight heparins on the properties of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Folia Histochem Cytobiol* 47: 17-23.
149. Vignoli A, Marchetti M, Russo L, Cantalino E, Diani E, Bonacina G, Falanga A (2011). LMWH bemiparin and ULMWH RO-14 reduce the endothelial angiogenic features elicited by leukemia, lung cancer, or breast cancer cells. *Cancer Invest* 29: 153-161.
150. Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Francis JL (2003). Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. *J Thromb Haemost* 1: 1972-1976.
151. Kuczka K, Baum K, Picard-Willems B, Harder S (2009). Long term administration of LMWH-pharmacodynamic parameters under therapeutic or prophylactic regimen of enoxaparin or tinzaparin in neurological rehabilitation patients. *Thromb Res* 124: 625-30.
152. Vignoli A, Marchetti M, Balducci D, Barbui T, Falanga A (2006). Differential effect of the low-molecular-weight heparin, dalteparin, and unfractionated heparin on microvascular endothelial cell hemostatic properties. *Haematologica* 91: 207-214.
153. Norrby K (2006). In-vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 10: 588-612.

154. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 49: 32-40.
155. Niemistö A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I (2005). Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE Trans Med Imaging* 24: 549-553.
156. Verma K, Gu J, Werner E (2011). Tumor endothelial marker 8 amplifies canonical Wnt signaling in blood vessels. *PLoS One* 6: 22334.
157. Whyte JL, Ball SG, Shuttleworth CA, Brennan K, Kielty CM (2011). Density of human bone marrow stromal cells regulates commitment to vascular lineages. *StemCell Rest* 6: 238-250.
158. Rema RB, Rajendran K, Ragunathan M (2012). Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. *Vasc Cell* 4: 8.
159. Narayanan G, R BS, Vuyyuru H, Muthuvel B, Konerirajapuram Natrajan S (2013). CTR1 silencing inhibits angiogenesis by limiting copper entry into endothelial cells. *PLoS One*. 8: 71982.
160. van Balkom BW, de Jong OG, Smits M, Brummelman J, den Ouden K, de Bree PM, van Eijndhoven MA, Pegtel DM, Stoorvogel W, Würdinger T, Verhaar MC (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and Mouse endothelial cells. *Blood* 121: 3997-4006.
161. Nethi SK, Mukherjee S, Veeriah V, Barui AK, Chatterjee S, Patra CR (2014). Bioconjugated gold nanoparticles accelerate the growth of new blood vessels through redox signaling. *Chem Commun (Camb)* 50: 14367-14370.
162. Nilforoushzadeh MA, Javanmard SH, Ghanadian M, Asghari G, Jaffary F, Yakhdani AF, Dana N, Fatemi SA (2014). The Effects of *Adiantumcapillus-veneris* on Wound Healing: An Experimental In Vitro Evaluation. *Int J Prev Med* 5: 1261-1268.
163. Manjunathan R, Ragunathan M (2015). In ovo administration of human recombinant leptin shows dose dependent angiogenic effect on chicken chorioallantoic membrane. *Biol Rest* 48: 29.

164. Manjunathan R, Ragunathan M (2015). Chicken chorioallantoic membrane as a reliable model to evaluate osteosarcoma-an experimental approach using SaOS2 cell line. *Biol Proced Online* 17: 10.
165. Zacharski LR, Ornstein DL, Mamourian AC (2000). Low-molecular- weight heparin and cancer. *Semin Thromb Hemost* 26: 69-77.
166. Mousa SA, Linhardt R, Francis JL, Amirkhosravi A (2006). Anti-metastatic effect of a non-anticoagulant low-molecular-weight heparin versus the standard low-molecular-weight heparin, enoxaparin. *Thromb Haemost* 96: 816-821.
167. Mousa SA, Mohamed S (2004). Inhibition of endothelial tube formation by the low molecular weight heparin, Tinzaparin, is mediated by tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 92: 627-633.
168. Mousa SA (2013). Comparative pharmacodynamic assessment of the antiangiogenesis activity of heparin and low-molecular-weight heparin fractions: structure-function relationship. *Clin Appl Thromb Hemost* 19: 48-54.
169. Yildiz C, Cetin A, Demirci F, Polat ZA, Kiyan T, Altun A, Cetin M, Yildiz OK, Goze I (2013). Antiangiogenic effects of diltiazem, imatinib, and bevacizumab in the CAM assay. *IJSRP* 3: 8.
170. Nowak-Sliwinska P, Ballini JP, Wagnières G, van den Bergh H (2010). Processing of fluorescence angiograms for the quantification of vascular effects induced by anti-angiogenic agents in the CAM model. *Microvasc Res* 79: 21-28.
171. Katrancioğlu N, Karahan O, Kilic AT, Altun A, Katrancioğlu O, Polat ZA (2012). Comparison of the antiangiogenic effects of heparin sodium, enoxaparin sodium, and tinzaparin sodium by using chorioallantoic membrane assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 23: 218-221.
172. Qian XP, Liu BR, Wan L, Hu J, Zhu LJ, Yu LX (2010). Anti-angiogenic effect of vinorelbine in combination with cetuximab in vitro and in vivo. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 32: 253-257.
173. John DH, William JG (2008). *EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy. EGFR signaling in invasion, angiogenesis and metastasis*. New York: Humana Press, 257-276.

174. Shaheen RM, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Jung YD, Tseng WW, Drazan KE, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM (2001). Inhibited growth of colon cancer carcinomatosis by antibodies to vascular endothelial and epidermal growth factor receptors. *Br J Cancer* 85: 584-589.
 175. Bhuvaneswari R, Yuen GY, Chee SK, Olivo M (2011). Antiangiogenesis agents avastin and erbitux enhance the efficacy of photodynamic therapy in a murine bladder tumor model. *Lasers Surg Med* 43: 651-662.
 176. Dogan OT, Polat ZA, Karahan O, Epozturk K, Altun A, Akkurt I, Cetin A (2011). Antiangiogenic activities of bemiparin sodium, enoxaparin sodium, nadroparin calcium and tinzaparin sodium. *Thromb Res* 128: 29-32.
- 

10. ÖZ GEÇMİŞ

KİŞSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No

Soyadı, Adı : ARSLAN, Turgay
Uyruğu : TC
Doğum tarihi ve yeri : 07.07.1984 Tokat/ Almus
Medeni hali : Evli
Telefon : 04623777980
E-Posta : turgay.arslan84@gmail.com
Yazışma adresi : Eski Samsun yolu cad. Batıkent sitesi
A1 blok kat 1 daire 4 Yıldızlı-Akçaabat
TRABZON

EĞİTİM DURUMU

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2006
Lise	Kadriye Moroğlu Lisesi	2000

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre (Yıl -Yıl)
1.	Dem ilaç	8 yıl (2008-)

YABANCI DİL

İngilizce

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Dem ilaç 2012/3.Dönem Toplantısı 23-29 Ağustos 2012 -Kapadokya Medikal ve Pazarlama Sınavı Üçüncüsü Ödülü
2. Dem ilaç 2013/1. Dönem Toplantısı 9-13 Ocak-İstanbul Medikal ve Pazarlama Sınavı İkincisi Ödülü

HOBİLER

Tiyatro, Gitar

