

T 1791

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANE



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSSEL KARACİĞER FİBROGENEZİ BOYUNCA⁺
HİPOKSİ İLE İNDÜKLENEBİLEN FAKTÖR 1-ALFA (HIF-1 α),
VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF),
TROMBOSPONDİN-1 (TSP-1), c-RAS EKSPRESYONU İLE
ANJİYOGENEZ ARASINDAKİ İLİŞKİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sevgi BOZOVA

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Gülsüm Özlem ELPEK

"Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 2004 04 0103 013 Proje No İle Desteklenmiştir."

Tezinden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir."

Antalya,2005

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince ilgi ve desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarıma, tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Gülsum Özlem ELPEK' e,

Birlikte çalıştığım öğretim görevlisi, uzman ve asistan arkadaşlarıma

Patoloji Anabilim Dalının tüm idari ve laboratuvar çalışanlarına,

Deney hayvanları laboratuvarı ünitesinde yardımlarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Oğuz K. BAŞKURT, Vet. Dr. Şakir ATALAY ve personeline,

İstatistiksel analizlerdeki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Hakan GÜLKESEN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Sevgi BOZOVA
Antalya, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi-vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1- GİRİŞ VE AMAÇ	1 - 4
2- GENEL BİLGİLER	5 -19
3- YÖNTEM VE GEREÇLER	20-24
3.1. Yöntem	20- 21
3.2. Histopatolojik-İmmunohistokimyasal inceleme	21- 23
3.3. İstatistiksel analizler	24
4- BULGULAR	25- 40
5- TARTIŞMA	41- 46
6- SONUÇLAR	47- 48
7- ÖZET	49
8- KAYNAKLAR	50- 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

D.E.N.A.	Dietilnitrozamin
H.I.F.- 1 α	Hipoksi ile indüklenebilen faktör (hypoxia-inducible factor)-1 alfa
M.V.D.	Mikrovasküler dansite (mikrodamar yoğunluğu)
T.S.P.-1	Thrombospondin (trombospondin) -1
V.E.G.F	Vasküler endotelyal büyüme faktörü(Vascular endothelial growth factor)
Y.H.	Yıldızsı hücreler

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa no:</u>
Şekil 4.1. Altıncı ve 7. grupta karaciğer yüzeyinde izlenen ince fibröz bantlar ve nodüller	26
Şekil 4.2. Hematoksilen-Eozin boyama yönteminde histopatolojik bulgular	27
Şekil 4.3. Yedinci grupta nodüllerin birinde izlenen displastik değişiklikler	28
Şekil 4.4. Gruplara göre MVD değerleri	30
Şekil 4.5. Gruplara göre MVD'nin istatistiksel değerleri	31
Şekil 4.6. Damarlarda CD34 pozitifliği	31
Şekil 4.7. Kontrol grubunda ve 7. grupta bağ dokusu içerisindeki damar yapılarında CD34 pozitifliği	32
Şekil 4.8. Gruplara göre VEGF boyanma yüzdeleri	33
Şekil 4.9. Gruplara göre VEGF boyanma değerleri	33
Şekil 4.10. Kontrol (a), 3. grup (b), 5. grup(c) ve 7. grupta (d) VEGF boyanması (x200)	34
Şekil 4.11. Kontrol (a), 3. grup (b), 5. grup(c) ve 7. grupta (d) HIF-1 α boyanması (x100)	34
Şekil 4.12. Gruplara göre HIF-1 α boyanma yüzdeleri	35

Şekil 4.13.	Gruplara göre HIF-1 α boyanma değerleri	36
Şekil 4.14.	Gruplara göre TSP-1 boyanma yüzdeleri	37
Şekil 4.15.	Gruplara göre TSP-1 boyanma değerleri	37
Şekil 4.16.	Fibrogenezisin bulunduğu 4. grup (a,b x100) ve 7. grupta (c, d x400) TSP-1 pozitifliği	38
Şekil 4.17.	Fibrogenezisin bulunduğu 4. grup (a x100) ve 7. grupta (b x100; c, d x400) c-ras pozitifliği	39
Şekil 4.18.	Periportal hepatositlerde c-ras pozitifliği	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa no:</u>
Çizelge 3.1. Kullanılan antikorların özellikleri	23
Çizelge 4.1. Deney planı	25
Çizelge 4.2. CD 34 ile belirlenen mikrodamar yoğunluklarının (MVD) gruplara göre istatistiksel değerleri	30
Çizelge 4.3. Gruplarda VEGF boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri	32
Çizelge 4.4. Gruplarda HIF-1 α boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri	35
Çizelge 4.5. Gruplarda TSP-1 boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri	36
Çizelge 4.6. Gruplarda c-ras boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri	38
Çizelge 4.7. Gruplar arasında tüm parametrelerin ortalamaları ve karşılaştırmaları	40
Çizelge 4.8. Çalışmadaki parametrelerin Spearmann-rank korelasyon testi ile saptanan r değerleri	40

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Siroz , en sık izlenen ölüm nedenleri arasında ilk 10 sırada yer alır. Komplikasyonlarının tedavisi, transplantasyon ve uzun süreli postoperatif bakım süreci düşünüldüğünde, morbidite ve mortalite oranı yüksek bir hastalıktır. Primer etyolojisi ne olursa olsun siroz, karaciğer hastalıklarında oluşan değişikliklerin ortak olan son evresidir (1).

Siroz gelişiminin temelinde progresif hücre hasarı nedeni ile oluşan hepatik fibrojeniz yatmaktadır (2). Yakın geçmişde yapılan çalışmalarda karaciğerde normalde yağ ve A vitamini depolayan, Disse aralığında bulunan yıldız hücrelerin (YH) siroz gelişimi sırasında aktivasyon ve proliferasyon göstererek myofibroblastlara dönüştüğü ve kollajen sentezleyerek fibrojenizi sağladıkları ortaya çıkarılmıştır (3,4,5). Hepatik fibrojeniz karaciğer hücre zedelenmesine karşı oluşan bir iyileşme cevabı olarak kabul edilse de, zamanla fibrozisin oluşturduğu parankimal nodüller safra akışını bozar, vasküler yapıların reorganizasyonu ile anormal bağlantılar ve şantlar oluşur (1,2). Bu şantlar ve sinuzoidlerdeki kapillarizasyon kandaki maddelerin hepatositlere ulaşımını kısıtlar ve oksijen dağılımını bozarak hipoksi oluşturur. Bu değişikliklere paralel olarak hipoksi ile indüklenen anjiogenez, miyokardiyal iskemi, serebral iskemi, proliferatif retinopati ve tümör gelişimi gibi pekçok patolojik durumda olduğu gibi sirozdaki fibrozise de hemen daima eşlik eden bir durumdur (6,7,8,9).

Hipoksi etkisini bilinen en potent anjiyogenik faktörlerden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üzerinden gösterir (6). VEGF'nün transkripsiyonunu indükleyip VEGF mRNA'sını stabilize ederek, hücrelerde ekspresyonunu artırır (10). Bu yolla kapiller proliferasyonu uyararak dokunun daha fazla kanlanması, bir başka deyişle dokuya daha fazla oksijen geçişini sağlar. Rejenere olan rat karaciğerinde gerek hepatositlerde gerek yıldız hücrelerde VEGF ve reseptörlerinin arttığı ve sinüzoidal endotel hücrelerinin proliferasyonuna katkıda bulunduğu, yine ratlarda parsiyel hepatektomi sonrasında VEGF administrasyonunun karaciğer rejenerasyonunu stimüle ettiği, karbon tetraklorid entoksikasyonundan sonra VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (11,12). Corpechot ve ark. , deneysel bilier sirozda hepatosellüler hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonunun anjiyogenez ile ilişkili olduğunu saptamış, VEGF'nün aktive YH tarafından eksprese edildiğini göstermişlerdir (2). Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde karaciğerde oluşan hücre zedelenmesinden sonra ortaya çıkan hipoksi ve anjiyogenezin fibrogenez ile birlikte progresyon gösterdiği ve hipoksinin karaciğer fibrozisine dolaysız olarak katıldığı açıktır.

VEGF gibi hipoksik şartlarda fonksiyonel duruma geçen bir başka faktör de hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF-1) dir. HIF-1, HIF-1 α ve HIF-1 β subunitelerinden oluşmaktadır (13,14,15). Normoksik şartlarda HIF-1 α degrade edilirken, hipoksizde HIF-1 β ile birlikte heterodimer

oluşturarak DNA'ya bağlanan fonksiyonel HIF-1 kompleksini oluşturmaktadır (16) HIF-1, aynı zamanda VEGF'i indükleyen bir transkripsiyon faktörü olarak da bilinmektedir ve VEGF dışında eritropoetin ve glikolitik enzimleri sentezleyen genleri de aktive ederek hipoksiye karşı doku direncini artırmaktadır (17). Karaciğerde HIF-1 α 'nın VEGF ile olan ilişkisi hepatosellüler karsinomda az sayıda çalışmada araştırılmış olmasına karşın (18), bilgilerimize göre fibrogeniz gelişiminde ve sirozda hipoksi ile yakın ilişkisi olan bu faktörün anjiyogenez ve VEGF ile ilişkisi araştırılmamıştır.

VEGF ve HIF-1 α ile ilişkili olan bir başka faktör "mutant ras"dır. Ras'ın bir protoonkogen olması nedeniyle önceki çalışmaların büyük çoğunluğu solid organ tümörlerinde yapılmış, tümöral dokuda ras'ın VEGF ekspresyonunu indükleyerek anjiyogenezi arttırdığı bildirilmiştir (19,20). Ras ekspresyonundaki artış, intratümöral küçük damar yoğunluğu ve endotelial proliferatif aktivite ile korele bulunmuştur (21,22). Ras onkogenini hedef alan tedavi yöntemleri ile anjiyogenez baskılandığında solid tümör büyümesinin inhibe edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (23). Ancak protoonkogenlerin sadece karsinogenezde değil normal hücre farklılaşması ve proliferasyonunda da rol oynadığı bilinmektedir ve sirozda ve hayvanlardaki siroz modellerinde ras protoonkogen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (24). Ayrıca Reif ve arkadaşları ratlarda oluşturulan deneysel sirozun ras

antagonisti olan farnesiltiosalisilik asid ile inhibe edilebildiğini göstermiştir (25).

Ras onkogeninin bir özelliği de VEGF ekspresyonunu artırırken öte yandan bir anti-anjiyogenik faktör olan trombospondin-1 (TSP-1) ekspresyonunu baskılayarak anjiyogeneze farklı bir yoldan stimulan etki göstermesidir (26). TSP-1, multifonksiyonel trimerik matriselüler bir protein olup tümör gelişimi ve vasküler yeniden şekillenme sırasında yeni damar oluşumunun güçlü bir inhibitörüdür (27).

Bilgilerimize göre hepatik fibrojenizde ve sirozda anjiyogeneze ile VEGF ekspresyonu arasındaki ilişki ve ras protoonkogen ekspresyonu az sayıda çalışmada ele alınmış olsa da bu iki parametre ile ilişkili olan HIF-1 α ve anjiyogeneze inhibitörü olan TSP-1 'in ilişkisi ve etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı; deneysel olarak oluşturulmuş karaciğer fibrojenizi boyunca oluşan anjiyogeneze ile VEGF, HIF-1 α , c-ras, TSP-1 ekspresyonu arasındaki ilişkinin ve bu dört parametrenin birbirleriyle olan ilişkisinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Siroz , en sık izlenen ölüm nedenleri arasında ilk 10 sırada yer almaktadır ve morbidite ve mortalite oranı yüksek bir hastalıktır. ABD'de yılda 27.000 , İngiltere'de 6000' den fazla ölüme neden olur (1). Bu derece sık görülmesine, yüksek morbidite ve mortalitesine rağmen siroz tedavisine medikal yaklaşım yetersizdir. Kronik karaciğer hastalığını tedavi etmeye yönelik yeni geliştirilen ilaçlar hepatik fibrozisin gelişimini ve sirozu başarılı bir şekilde engelleyememektedir (29). Ayrıca siroz ile hepatokarsinogenez arasında da güçlü bir korelasyon vardır. Çünkü, hepatoselüler karsinom çoğunlukla siroz zemininde gelişir (30).

Sirozda, klinik bilgilerin ışığında, izlenen morfolojik görünümüne göre etyolojiye yönelik olası gruplandırmalar yapılabilir. Etiyoloji; coğrafik ve sosyal nedenlere bağlı olarak farklılıklar gösterir. Batı dünyasında başlıca kategoriler aşağıdaki gibidir:

Alkol bağımlılığı	% 60-70
Viral hepatit	% 10
Biliyer hastalıklar	% 5-10
Hereditör hemokromatozis	% 5
Kriptojenik siroz	% 10-15

Daha az sıklıkta görülmesine karşın alfa-1-antitripsin eksikliği, Wilson hastalığı, familial kolestatik hastalıklar gibi kalıtsal nedenler çocuklarda veya genç erişkinde siroza neden olabilir (1).

Etyolojide; hepatik kan akımını etkileyen intra- ve ekstra-hepatik şantların gelişimi gibi mekanik nedenler sorumlu olabileceği gibi, organın fizyolojik görevlerini yapmasını engelleyerek yetmezliğe götüren fonksiyonel nedenler de olabilir. Büyük kısmı alkol bağımlılığı, kronik hepatit, biliyer hastalıklar, demir aşırı yüklenimi ve çeşitli kalıtsal metabolik defektlerden kaynaklanır. Sonuçta; karaciğerde ilerleyici bir hasar oluşurken organın sahip olduğu fonksiyonel rezerv, asıl nedeni ve klinik etkilenmeyi uzun süre maskeleyemeye yeterlidir. Parankimal hasarın ilerlemesi ve safra akımının bozulması, aylar-yıllar içinde hepatik fonksiyonu bozarak hayatı tehdit eder hale gelir. Sonuçta sağ kalımı belirleyen karaciğer yetmezliğinin gelişimidir. Sirozun pekçok formu aynı zamanda hepatoselüler karsinom riski taşır (1).

Primer etyolojiden nisbeten bağımsız olarak siroz, kronik karaciğer hastalıklarında oluşan değişikliklerin ortak olan son evresidir (1). Ancak; son evre olarak kabul edilmesine karşın siroz, ilerleyici fibrozis ile parankimin nodüllere bölünerek normal yapının distorsiyona uğradığı dinamik bir durumdur.

Siroz "diffüz " karakterlidir ve progresyon gösteren fibrozis ile normal karaciğer yapısının bozulup anormal nodüllerin oluşması olarak tanımlanabilir. Fibrozis; portal-santral, portal-portal, santral-santral uzanım gösteren ince bandlar şeklinde olabileceği gibi nodüllerin yerini alabilecek derecede geniş skarlar şeklinde de olabilir. Sirozda gelişen fibrotik nodüller, yoğun vasküler proliferasyon ile birlikte ve skar gelişimine daima vasküler proliferasyon eşlik eder. Hipoksi ve anjiyogenez

ise kronik karaciğer hasarında yara iyileşmesi şeklinde fibrogenez ile birlikte ilerler (31).

Nodüller, hepatik parankimin fibrozis ile izolasyonundan oluşur. Nodüller, çapı 3mm.' ye kadar olan mikronodüller veya 3 mm.' den birkaç santimetreye kadar ulaşan makronodüller şeklinde olabilir. Sonuç olarak tüm karaciğerin normal parankimal yapısı bozulur.

Siroz için olması gereken özellikler;

Organın fokal olarak değil bütünüyle etkilenmesi,

Nodüleritenin

ve Fibrozisin varlığıdır. Bu tanıma her ne kadar dahil edilmemiş olsa da parankimdeki vasküler değişiklikler, sirozun tamamlayıcı bir parçasıdır. Parankimal hasar ve fibrozis nedeni ile vasküler yapılanma reorganizasyona gider; organa hepatik arter-portal ven aracılığıyla gelen kan akımı ile hepatik ven aracılığıyla giden kan akımı arasında anormal bağlantılar-şantlar gelişir. Vasküler hasar ve kan akımındaki bu değişiklikler organın fibrotik ve nodüler bir organ haline dönüşmesine katkıda bulunur. Sirozda ayrıca, perfüzyonda ve sinuzoidal geçirgenlikte ciddi bozulmalar olur (32) ve bu da hepatosellüler hipoksiye neden olur. Hipoksinin gelişiminde etkili olduğu düşünülen mekanizmalar ise şöyledir: intrahepatik şantlar (33), vazokonstrüksiyon ve tromboz (34), sinuzoidlerin kapillarizasyonu (35,36). Kapillarizasyon sırasında sinuzoidler; kan ile hepatosit arasında eriyik alışverişini bozan ve normalde var olmayan bazal membran ile çevrilererek kapiller damarlara dönüşürler. Siroz gelişiminden önce de sinuzoidal perfüzyonda bozulma gözlenebilir. Şu da gözden kaçırılmamalıdır ki sirozda

gelişen anjiyogenez, VEGF ile oluşumu indüklenen yeni damarların immatüritesi ve geçirgenliği nedeni ile kısmen yetersiz olabilir, bu nedenle de doku hipoksisini düzeltemeyebilir (37).

Sirozda izlenen nodüllerde rejenerasyon olmayabilir ve siroz gelişimini etkileyen kritik bir faktör olmasına rağmen rejenerasyon siroz tanımı için şart değildir.

Sirozu oluşturan üç patolojik mekanizma; hücre ölümü, fibrozis ve rejenerasyondur. Hücre ölümü, karaciğer hasarının herhangi bir formunda ortaya çıkabilir ve bir kere başladıktan sonra istikrarlı bir şekilde devam eder. Karaciğer hasarı ve hücrelerin hasara karşı verdikleri yanıt arasındaki kompleks ilişkiler siroza giden patolojik olayların temelini oluşturur. Hasara karşı verilen yanıtta; fibrojenik medyatörler, perisinuzoidal yıldız hücreler ve olasılıkla portal alanda lokalize fibroblastlar tarafından oluşturulan anormal ekstrasellüler matriks birikimi önemlidir. Yani, siroz için gerekli olan progresif fibrozisin varlığıdır. Normal karaciğerde matriks; hepatositler, yıldız hücreler ve sinuzoidal endotel hücreleri tarafından üretilir. Portal alanda, santral ven çevresinde ve az miktarda Disse aralığında olmak üzere Tip I ve III kollajen mevcuttur. Hepatositerin Disse aralığına bakan kenarlarında ise ince bandlar tarzında Tip IV kollajen (retikulin) uzanır. Sirozda; Tip I ve III kollajen, belirtilen lokalizasyonlara ek olarak lobül içinde de birikir ve ince-kalın septal bandlar oluşturur.

Sirozda aşırı olan kollajen üretimi perisinuzoidal yıldız hücreler (İto hücreleri olarak da bilinir) tarafından gerçekleştirilir. Yıldız hücreler , subendotelyal Disse aralığında

ve bazıları hepatositler arasındaki perisinuzoidal boşlukta lokalizedirler. Normalde vitamin A depolayan hücreler iken sirozda aktive olurlar ve proliferasyon-kontraksiyon potansiyeli olan miyofibroblast benzeri hücrelere dönüşürler. Alkol veya karbon tetraklorür (CCI4) ile indüklenen deneysel siroz modellerinde; fibrozis gelişimi ile beraber yıldız hücreler transforme olurlar. Yıldız hücreleri bölünmeye ve aşırı ekstrasellüler matriks üretimine iten neden, Kupffer hücreleri ve diğer yangı hücreleri tarafından üretilen sitokinlerdir. Kollajen tip I, III, IV, laminin'e ait gen amplifikasyonları ve artmış mRNA ekspresyonları yıldız hücrelere sınırlıdır, hepatositlerin matriks üretme potansiyelleri olmasına karşın sirozda bu değişiklikler izlenmez.

Fibrotik ve sirotik karaciğer dokusunda total kollajen miktarı 8 kata kadar artar. Bu özellikle Tip I kollajen artışıdır ve primer kaynağı yıldız hücrelerdir. Disse aralığında Tip III, IV gibi diğer kollajen tipleri de artar. Sirotik karaciğerde kollajen artışı yanı sıra laminin, fibronektin gibi non-kollajenöz ekstrasellüler matriks elemanları olan glikoprotein ve proteoglikanlar 2 katı ve daha fazlasına kadar artar.

Laminin hücre adezyonu, migrasyonu, farklılaşması ve büyümesinde etkilidir ve kapiller formasyonda önemli bir medyatördür. vWF (von Willebrand Faktör) – FVIII ilişkili antijen-vasküler hasar sonrası trombositlerin subendotelial tutunmasını sağlayan büyük bir glikoproteindir ve normalde hepatik sinuzoidal endotel hücrelerinde bulunmaz, fakat deneysel fibrozis gelişiminde ekprese olurlar.

Disse aralığında artış gösteren ekstrasellüler matriks, hepatositler ile sinuzoidal kan akımı arasında major bir bariyer oluşturur. Ratlar üzerinde yapılan çalışmalarda normalde % 5 olan total ekstrasellüler matriks (ESM) oranı sirozda % 25-40' a ulaşır. Disse aralığındaki ESM artışı ile beraber sinuzoidal endoteldeki fenestrasyon kaybı "sinuzoidlerin kapillarizasyonu" olarak adlandırılır. Yani sinuzoidler; non-fenestre endotel hücreleri haline gelir, kan ile hepatosit arasında solüt alışverişini bozan ve normalde var olmayan bazal membran ile çevrilerek kapiller damarlara dönüşürler. Böylece kapillarizasyon tamamlanır.

Normalde sinuzoidler, fenestre sinuzoidal endotel ile döşelidir ve Disse aralığında saçılmış halde bulunan ve yağ depolayan yıldızlı hücreler ile az miktarda ince retiküler kollajen fibrilleri vardır. Sirozda yıldızlı hücreler proliferer olur, miyofibroblastlara dönüşür ve fibriller kollajen ile diğer ESM proteinlerini üretir.

Siroz gelişiminde anahtar olaylar; perisinuzoidal yıldızlı hücreler, ekstrasellüler matriks birikimi ve parankimal mikrodamarlanmanın değişimi yani sinuzoidal kapillarizasyondur.

Anormal matriks birikimi ise hücre hasarı ve yangının en yoğun olduğu yerlerde gerçekleşir. Fibrojenezi tetikleyen faktörler çeşitlidir: kronik yangı ve yangı hücrelerinden salınan sitokinler (TNF-alfa, TNF- beta, IL-1, PDGF) , hasar gören endojen hücrelerden (Kupffer hücreleri ; endotelyal hücreler, hepatositler, safra kanalı epiteli hücreleri) salınan sitokinler, ekstrasellüler matriksin bozulması, toksinlerin yıldızlı hücreler

üzerine direkt toksik etkisi vb. Sonuçta, hepatik fibrozisde perisinuzoidal yıldızlı hücrelerin aktivasyonu esastır.

Aşırı matriks üretimi yanında matriks degradasyonu da sirozun önemli bir parçasıdır. Matriksin yeniden yapılanmasında metaloproteinazlar ve inhibitörleri anahtar role sahiptirler. Ekstrasellüler matriksdeki değişiklikler yıldızlı hücreler ve Kupffer hücrelerince üretilen proteinazlar tarafından başlatılıyor olabilir.

Siroz gelişiminin temelinde progresif hücre hasarı nedeni ile oluşan hepatik fibrogenez yatmaktadır (2). Hepatik fibrogenez; hasara karşı organın yara iyileşmesi şeklinde verdiği bir yanıt olarak kabul edilebilir. Bu yanıt ekstraselüler ortamın kompozisyonunda (matriksde) kalitatif ve kantitatif bir değişim ile karakterlidir. Yakın geçmişde yapılan çalışmalarda bu değişim sırasında karaciğerde normalde yağ ve A vitamini depolayan, Disse aralığında bulunan yıldızlı hücrelerin (YH) siroz gelişimi sırasında aktivasyon ve proliferasyon göstererek myofibroblastlara dönüştüğü ve kollajen sentezleyerek fibrogenezi sağladıkları ortaya çıkarılmıştır (3,4,5). Hepatik fibrogenez karaciğer hücre zedelenmesine karşı oluşan bir iyileşme cevabı olarak kabul edilse de, zamanla fibrozisin oluşturduğu parankimal nodüller safra akışını bozar, vasküler yapıların reorganizasyonu ile anormal bağlantılar ve şantlar oluşur (1,2). Bu şantlar ve sinuzoidlerdeki kapillarizasyon kandaki maddelerin hepatositlere ulaşımını kısıtlar ve oksijen dağılımını bozarak hipoksi oluşturur. Bu değişikliklere paralel olarak hipoksi ile indüklenen anjiogenez ; miyokardiyal veya serebral iskemi, proliferatif retinopati ve tümör gelişimi gibi

pekçok patolojik durumda olduğu gibi sirozdaki fibrozise de hemen daima eşlik eder (6,7,8,9). Hipoksi etkisini bilinen en potent anjiyogenik faktörlerden biri olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) üzerinden gösterir (6). Hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonu hem transkripsiyonel aktivasyonu (38) hem transkriptlerin stabilizasyonunu kapsar (39). Hipoksi böylece, VEGF'ün transkripsiyonunu indükleyip VEGF mRNA'sını stabilize ederek, hepatositlerde ekspresyonunu artırır (10). Bu yolla kapiller proliferasyonu uyararak dokunun daha fazla kanlanmasını, bir başka deyişle dokuya daha fazla oksijen geçişini sağlar. Aktive olmuş yangı hücreleri tarafından salınan sitokinler veya büyüme faktörleri de (EGF, HGF, PDGF, TGF-alfa) VEGF ekspresyonunu artırıyor olabilir (40-44). Ancak deneysel modellerde yangı orta derecede olup hepatositlerde izlenen artmış VEGF ekspresyonu paterni daha çok hipoksi alanları ile paralellik göstermektedir (6). Normal karaciğer dokusunda VEGF immunreaktivitesi santral ven çevresinde ilk sıra perivenüler hepatositler ile sınırlıdır. Perivenüler alan parankimin en hipoksik alanıdır. Fibrotik karaciğerde; yani DENA alımının 5.-6. haftasında olan rat karaciğerlerinde ise VEGF ekspresyonu -ve paralelinde dokuda hipoksi belirteci olan pimonidazol-heterojen dağılımlı olmak üzere hepatositlerin % 30 'unda izlenmiştir. Sirotik rat karaciğerinde (8.-10. hafta) ise hepatositlerin % 90'dan fazlasında pozitif immunreaksiyon dikkati çekmiştir (2).

Sirozda gelişen fibrotik nodüller, yoğun vasküler proliferasyon ile birlikte dir. Sirozda her ne sebeple olursa olsun

sinuzoidal perfüzyonun bozulduğu bilinmektedir. İnsanda ve deneysel sirozda izlenen rejeneratif nodüller, yoğun perinodüler vasküler ağ ile çevrilidir (31). Bu çok sayıdaki kıvrımlanma gösteren mikrodamarlar intrahepatik vasküler dallardan köken alırlar, fibröz onarım proçesi ile birlikte progresyon gösterirler ve tıkalı olan yol üzerinden geçerler (31). İntrahepatik şantlar ve sinuzoidlerin kapillarizasyonu sonucu hepatositlere optimum kan akımı sağlanamaz ve hipoksi oluşur. Sirotik dokuda hipoksi ve takiben anjiyogenez oluşur (6). VEGF ile fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) günümüze değin bilinen en etkili anjiyogenik faktörlerdir; tümör gelişimi ve yara iyileşmesi ile ilgili olarak vasküler proliferasyondaki rolleri farklı organlarda gösterilmiştir (7). Ayrıca VEGF ekspresyonunu artıran başlıca indükleyicinin hipoksi olduğu gösterilmiştir (52). VEGF bu etkisini oksijen dağılımını artırmak üzere kapillerlerin lokal proliferasyonunu stimüle ederek göstermektedir (52). Rosmorduc ve ark. tarafından deneysel karaciğer fibrogenezi boyunca anjiyogenik faktörler olan VEGF ve yanı sıra FGF-2'nin vasküler proliferasyona neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada siroz gelişiminden önce hepatositlerde hipoksi oluştuğu ve hemen ardından VEGF'ün indüklendiği gösterilmiştir. Hepatositlerdeki hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonu, fibrogenez ile ilişkili mikrovasküler proliferasyonda tetikleyici faktör olabilir ve bu da karaciğerin yeniden yapılanmasına (remodelling) katkıda bulunuyor olabilir (6).

Rejenere olan rat karaciğerinde VEGF ve reseptörlerinin arttığı ve sinuzoidal endotel hücrelerinin proliferasyonuna katkıda bulunduğu, yine ratlarda parsiyel hepatektomi

sonrasında VEGF administrasyonunun karaciğer rejenerasyonunu stimüle ettiği, karbon tetraklorür (CCl₄) entoksikasyonundan sonra VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (11,12). Corpechot ve ark., deneysel sirozda hepatosellüler hipoksi ile indüklenen VEGF ekspresyonunun anjiyogenez ile ilişkili olduğunu saptamış, VEGF'ün aktive yıldız hücreler tarafından eksprese edildiğini göstermiştir (2). Hipoksik şartlar altında, VEGF yıldız hücrelerin yanı sıra vasküler perisitlerin aktivasyonunu ve proliferasyonunu da sağlamaktadır (45).

Hipoksi, VEGF induksiyonu ve anjiyogenez, sirotik lezyonlardan önce ortaya çıkar (6). Yani siroz gelişiminden önce oluşan erken dönemdeki hipoksi karaciğerin kan akımını bozmayabilir (56). Ratlarda immunohistokimya ile hepatositlerde VEGF'ün erken induksiyonu gösterilmiştir. Hipoksi, VEGF'ünü hem mRNA hem protein düzeyinde indükler (57,58). Bu VEGF ekspresyonu; VEGF izoformlarının transkript seviyelerindeki (VEGF 120 ve VEGF 164) artış ile paralellik göstermektedir. Bu izoformlar vasküler endotel hücrelerin direkt olarak proliferasyon ve migrasyonunda etkili olmaktadır. Aynı zamanda mikrodamarların dolaşımdaki makromoleküllere geçirgenliğini artırmaktadır. İnsanda bulunan VEGF 189 izoformu ise ekstraselüler matrikse bağlanır, aktivasyon için proteazlar tarafından hidrolize ihtiyaç duyar (59). VEGF ayrıca, endotel hücrelerinde bazı proteazların ekspresyonunu indükler (60), endotel hücrelerini ve monosit prokoagulant aktiviteyi stimüle eder (61). Bu şekilde dolaylı da olsa monosit

migrasyonu ve aktive nötrofil adhezyonu ile karaciğerdeki mikrovasküler yapılanmayı indükler (61).

Eksperimental bilier siroz oluşturulan ratlarda, hepatic vasküler proliferasyonun hepatosellüler hipoksiye yanıt olarak VEGF tarafından lokal olarak indüklenebildiği gösterilmiştir (6). Hipoksi tek başına hepatositlerde VEGF ile beraber kollajen Tip I ekspresyonunu artırır; bu da hipoksinin hem anjiyogenez hem fibrogenez aracılığı ile kronik karaciğer hastalığının progresyonuna katıldığını göstermektedir (2).

Ratlarda, CCl₄ entoksikasyonu sonrası yıldız hücrelerde ve Kupffer hücrelerinde VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (11). VEGF, endotelial hücreler üzerindeki etkisini Flt-1 ve Flk-1 reseptörleri aracılığı ile gösterir. Corpechot ve ark., sirotik karaciğerde Flt-1 mRNA ekspresyonunda artış izlerken Flk-1 mRNA ekspresyonunda farklılık görememişlerdir. Ankoma-Sey ve ark. ise CCl₄ entoksikasyonu sonrası hepatic yıldız hücrelerde hem Flt-1 hem Flk-1 ekspresyonlarında artış tespit etmişlerdir, ancak bu siroz gelişiminden önceki evrelerde gözlemlenmiştir (45). Aynı şekilde, Flk-1 ekspresyonunda bir değişim olmaksızın Flt-1 ekspresyonundaki artış hipoksiye maruz kalan insan (human) umbilikal ven endotel hücrelerinde de bildirilmiştir (46). Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde karaciğerde oluşan hücre zedelenmesinden sonra ortaya çıkan hipoksi ve anjiogenezin fibrogenez ile birlikte progresyon gösterdiği ve hipoksinin karaciğer fibrozisine dolaysız olarak katıldığı açıktır.

VEGF gibi hipoksik şartlarda fonksiyonel duruma geçen bir başka faktör de hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 (HIF-1)'dir.

HIF-1 ile regüle edilen VEGF, en potent anjiyogenik faktörlerden biridir. Hipoksi sonucunda HIF-1 aracılığıyla VEGF'in transkripsiyonu indüklenir. VEGF mRNA'sının stabilizasyonundan sonra hücre içindeki VEGF ekspresyonu artar (27,28). Bu şekilde kapiller proliferasyon uyarılır ve dokunun kanlanması, oksijen ihtiyacı ve diğer metabolik gereksinimleri karşılanır. HIF-1 ise, HIF-1 α ve HIF-1 β subunitelerinden oluşmaktadır (13,14,15). Normoksik şartlarda HIF-1 α degrade edilirken, hipoksizde HIF-1 β ile birlikte heterodimer oluşturarak DNA'ya bağlanan fonksiyonel HIF-1 kompleksini oluşturmaktadır (16). HIF-1, aynı zamanda VEGF'i indükleyen bir transkripsiyon faktörü olarak da bilinmektedir ve VEGF dışında eritropoetin ve glikolitik enzimleri sentezleyen genleri de aktive ederek hipoksiye karşı doku direncini artırmaktadır (17). Karaciğerde HIF-1 α 'nın VEGF ile olan ilişkisi hepatosellüler karsinomda az sayıda çalışmada araştırılmış olmasına karşın (18), bilgilerimize göre fibrojeniz gelişiminde ve sirozda hipoksi ile yakın ilişkisi olan bu faktörün anjiyogenez ve VEGF ile ilişkisi araştırılmamıştır.

Anjiyogenez solid tümörlerin büyümesi ve metastazı için gerekli bir durumdur ve anjiyogenezin inhibisyonu kanser tedavisinde umut verici bir yöntemdir. Anjiyogenezdeki rolünden dolayı VEGF ve reseptörleri ile HIF-1 α , anti-anjiyogenik tedavide önemli hedeflerdir. HIF-1, hipoksi ile aktiflenen ve VEGF sentezini regüle eden bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 aktivitesi eldeki mevcut HIF-1 α seviyesine bağımlıdır ki, bu durum da HIF-1 α 'yı önemli bir hedef haline getirmektedir. Yeo ve ark. yaptıkları çalışmada YC-1'in HIF-1'i hedeflediğini ve in vivo

olarak tümör anjiyogenezini inhibe ettiğini göstermişlerdir (62). Hipoksik şartlar altında YC-1 ile HIF-1 α ekspresyonu inhibe edilmiş, VEGF (ve aldolaz A, enolaz 1) üzerindeki indükleyici etkisi engellenmiştir. *In vivo* , YC-1 tedavisi alan farelerde hepatosit hücresi kökenli ksenograft tümörlerin büyümesi engellenmiştir. YC-1 tedavisi alan farelerde daha az damar sayılmış olup HIF-1 α protein ekspresyonu ve HIF-1 α tarafından regüle edilen genler daha düşük oranlarda tespit edilmiştir (62). YC-1, umut verici potansiyel anti-tümör bir ajan olarak HIF-1 'i hedef almaktadır.

VEGF ve HIF-1 α ile ilişkili olan bir başka faktör "mutant ras"dır. Ras'ın bir protoonkogen olması nedeniyle önceki çalışmaların büyük çoğunluğu solid organ tümörlerinde yapılmış, tümöral dokuda ras'ın VEGF ekspresyonunu indükleyerek anjiogenezi artırdığı bildirilmiştir(19,20). Ras ekspresyonundaki artış, intratümöral küçük damar yoğunluğu ve endotelial proliferatif aktivite ile korele bulunmuştur (21,22). Ras onkogenini hedef alan tedavi yöntemleri ile anjiyogenez baskılandığında solid tümör büyümesinin inhibe edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (23). Ancak protoonkogenlerin sadece karsinogenezde değil normal hücre farklılaşması ve proliferasyonunda da rol oynadığı bilinmektedir ve siroz karaciğerinde ve hayvanlardaki siroz modellerinde ras protoonkogen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (24). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada sirotik karaciğerlerin % 90,9'unda sirotik nodüllerde hepatositlerin çoğunluğunda *in situ* hibridizasyon yöntemi ile diffüz olarak c-H-ras mRNA'sında artış gözlemlemişlerdir (24). Yine sirozda p21 ras onkoproteini de

immunositokimyasal olarak sirotik nodülleri oluşturan hepatositlerde %87 (47) ve % 94 (48) oranında gösterilmiştir. Bazı çalışmalarda c-N-ras (49) ve c-Ki-ras (50) mRNA sirozda yüksek seviyelerde bulunmuştur. Ayrıca Reif ve ark. ratlarda oluşturulan deneysel sirozun ras antagonisti olan farnesiltiosalisilik asid ile inhibe edilebildiğini göstermişlerdir (25).

Ras onkogeninin bir özelliği de VEGF ekspresyonunu artırırken öte yandan bir anti-anjiyogenik faktör olan trombospondin-1 (TSP-1) ekspresyonunu baskılayarak anjiyogenezde farklı bir yoldan stimulan etki göstermesidir (26). TSP-1, multifonksiyonel trimerik matriselüler bir protein olup tümör gelişimi ve vasküler yeniden şekillenme (remodelling) sırasında yeni damar oluşumunun güçlü bir inhibitörüdür (27).

Trombospondinler 5 ayrı tipi bulunan kalsiyum bağlayan homotrimer yapıda ekstraselüler yapıda glikoproteinlerdir (53). Prototip olarak belirtilen TSP-1, yara iyileşmesi ve tümör büyümesi sırasında anjiyogenezin regülasyonu, yangısal cevap ve trombosit agregasyonunda görev yapar. TSP-2 de aynı görevlerin yanı sıra esas olarak karilaj doku ve diğer bağ dokuda eksprese edilir; kondrosit tutunması , farklılaşması ve kartilaj dokunun ekstrasellüler matriks yapımında etkilidir. TSP-3 ve TSP-4 hakkında çok az bilgi mevcuttur. Hücre tipine ve TSP tipine bağlı olarak hücre iskelet organizasyonu ve hücre migrasyonu, hücre proliferasyonunun modülasyonu gibi diğer ekler ile ekstrasellüler proteazlar, sitokinler ve büyüme faktörleirinin fonksiyonları üzerinden indirekt etkileri vardır. TSP-1 ve TSP-2 içerdikleri "tip 1 bölge" nedeni ile anjiyogenezin

inhibisyonunu sağlarlar. TSP-1 ve TSP-2 meme karsinomlarında tümör dokusunda endotel hücreleri ile stromal fibroblastlarda kuvvetle eksprese edilir (54). Özellikle TSP-1 'in anti-anjiyogenik etkisi yanı sıra ortamdaki miktarına bağımlı olarak proanjiyogenik etkisinin olabileceği de bildirilmiştir. Nitekim Poon ve ark. 60 hepatoselüler karsinom olgusundan %52 'sinde tümör hücrelerinde , % 65 'inde stromal hücrelerde yüksek TSP-1 ekspresyonu izlemişlerdir ve VEGF ekspresyonu ile korele bir şekilde yüksek TSP-1 ekspresyonunun anjiyogenezi indükleyen proanjiyogenik bir etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir (55). TSP-1 transkripsiyonu c-fos, c-jun ve ras onkogenleri tarafından inhibe edilir. TSP-1 endotel hücre göçünü engelleyerek, endotel hücre apoptozisini indükleyerek ve büyüme faktörlerinin mobilizasyonunu inhibe edip endotel hücre yüzeylerine ulaşmasını engelleyerek anjiyogenezi inhibe eder. TSP-1'in yokluğunda VEGF mobilizasyonu daha yüksek seviyelerdedir. Tümör tedavisinde TSP-1 veya TSP-2 düzeylerini artırmak suretiyle anjiyogenez inhibe edilerek tümör büyümesi yavaşlatılmaktadır. TSP-1 düzeyinin artırılması, kemoterapötik ajanların anti-anjiyogenik ve anti-tümör etki göstermelerine aracılık etmektedir (55).

Bilgilerimize göre hepatik fibrojenizde ve sirozda anjiogenez ile VEGF ekspresyonu arasındaki ilişki ve ras protoonkogen ekspresyonu az sayıda çalışmada ele alınmış olsa da bu iki parametre ile ilişkili olan HIF-1 α , bir anjiogenez inhibitörü olan TSP-1 'in ilişkisi ve etkisi bilinmemektedir.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Yöntem

Deney gurubu 29 rat, kontrol grubu 8 rat olmak üzere , vücut ağırlığı ortalama 250 gr olan toplam 37 adet erkek erişkin Wistar rat çalışmaya dahil edildi. Ratlar maksimum 5 rat bir kafese alınarak çeşme suyu ve normal diyet ile beslenerek 12 saatlik ışık döngüsü ile takip edildi. Deney grubundaki ratlara Dietilnitrozamin (DENA, Sigma, St Quentin Yvelines, France) 100 mg/kg-vücut ağırlığı şeklinde haftada bir kez intraperitoneal yol ile verildi. Deney grubu toplam aldıkları haftalık DENA enjeksiyonu sayısına göre 6 gruba ayrılarak bu gruplara sırasıyla 2 (n=4), 4 (n=5), 5 (n=5), 6(n=5), 8 (n=5), 10 (n=5) hafta boyunca DENA enjekte edildi. Kontrol grubuna ise haftada bir kez yine 100mg/kg-vücut ağırlığı şeklinde hesaplanarak serum fizyolojik (% 0.9 Na Cl) intraperitoneal enjekte edildi. Ratlar son enjeksiyonlarından 2 hafta sonra eter inhalasyonu ve servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Hepatektomi ile elde edilen karaciğere ait doku örneklerinin bir bölümü HIF-1 α , VEGF ve TSP-1'in immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler taze dokuyu gerektirdiğinde hemen likid nitrojen ile dondurulup -70 derecede saklandı. Karaciğerin diğer bölümü ise; immunohistokimyasal boyama yöntemi ile c-ras ekspresyonunun değerlendirilmesi, hematoksilin-eozin histokimyasal boyama yöntemi histopatolojik bulguların değerlendirilmesi ve küçük damar sayımı ile anjiogenezin değerlendirilmesinde gerekli olan CD 34

immunohistokimyasal boyama yönteminin uygulanması amacıyla % 10 'luk tamponlu nötral formalinde fikse edilerek parafine gömüldü.

3.2. Histopatolojik – İmmunohistokimyasal inceleme

HIF-1 α , TSP-1 ve VEGF immunohistokimyasal boyaları için -70 derecede saklanan doku örneklerinde 6 mikrometre kalınlığında frozen kesitler kromalinli lamlara alınarak Streptavidin –Biotin tekniği uygulandı. Alınan kesitler 30 dk süreyle havada kuruduktan sonra 10 dk soğuk asetonda fiske edildi ve ardından 3 kere 5 dk boyunca PBS ile yıkandı. PBS ile dilue edilmiş %1 hidrojen peroksit kullanılarak 10 dk inkübasyon sonrası 2 kere 5 dk boyunca PBS ile tekrar yıkandı. Bir saat boyunca PBS ile hazırlanan %1,5 dilusyonda blocking serum ile inkübe edildi. Ardından oda sıcaklığında 30 dakika boyunca primer antikor ile inkübe edildi. Tekrar 3 kere 5 dakikalık PBS yıkaması yapıldı. Otuz dakika biotinli sekonder antikor ile inkübe edildi. Üç kere 5 dakikalık PBS yıkaması ardından 30 dk AB enzim reagent ile inkübe ve tekrar PBS ile yıkandı (3x5 dk). 1-3 damla peroksidaz substratı ile 10 dk inkübasyon sonrası iyonize su ile 5 dk yıkandı. Son olarak zıt boyama için hematoksilin uygulandı.

c-ras ve CD 34'e yönelik immunohistokimyasal boyama için parafin bloklardan 4 μ m kalınlığındaki kesitler hazır 'chromalium-gelatin adhesive' ile kaplı lamlar üzerine alındı. 55°C'de etüvde bir gece eritilip, ksilolde iki kere 5'er dakika bırakılarak deparafinize edildi. Daha sonra ksilol ve azalan

derecelerde alkollerden geçirilip 1 dakika distile suya alınarak hidrate edildi. Bundan sonra kesitlere antijenin yeniden kazanılması amacıyla 'Antijen Retrieval' işlemi uygulandı. Bu işlem, 0.01 M sitrat solüsyonu içinde pH 6.0'da sıvı seviyesi lamaların üzerini kapatacak ve kesitler kurumayacak şekilde 90°C'de 20 dakika mikrodalga fırında kaynatılması ile gerçekleştirildi. Daha sonrada oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı.

Endojen peroksidaz enzim blokasyonu için %3'lük H₂O₂ solüsyonu ile kesitler 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra preparatlar tamponlanmış fosfat solüsyonunda yıkanarak 5 dakika bekletildi. Zemin boyanmasını önlemek amacıyla kesitler 5-10 dakika 'blocking' solüsyonunda bekletildi. Daha sonra preparatlar kurulandı. Primer antikor ile üstleri kaplanan doku kesitleri c-ras ve CD 34 ile 1 saat inkübe edildi. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Primer antikor ile enzim taşıyan antikor arası bağlayıcı görev yapan Linking Reagent ile doku kesitleri 15 dakika inkübe edildi. Labelling Reagent streptavidin ile konjuge edilmiş 'horseradish' peroksidaz ile dokular 15 dakika inkübe edildi. Kesitler tamponlanmış fosfat solüsyonunda 5 dakika bekletildi. 'chromogenic substrate' (DAB) ile 5 dakika inkübe edildi. Preparatlara Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve artan derecelerden alkollerden ve ksilolden geçirilip lamelle kapatıldı.

Her boyama için tüm inkübasyon basamakları oda sıcaklığında ve nemli ortamda gerçekleştirildi. Renklendirici olarak Diaminobenzidin kullanıldı. Oluşan kahverengi renk

reaksiyonu pozitif olarak kabul edilip ışık mikroskopunda değerlendirildi.

VEGF, HIF- 1 α , ras ve TSP-1 için immunohistokimyasal yöntem sonrası rat karaciğer dokularında boyanmanın varlığı , şiddeti ve yaygınlığı değerlendirildi.

CD 34 ile mikrodamar yoğunluğunun (MVD) değerlendirilmesinde, öncelikle küçük büyütmede (x 50 veya x100'de) kesitler tarandı. En yüksek mikrodamar yoğunluğuna sahip 'hot spot' 10 alanda x 200 büyütmede, mikrodamar sayımı yapıldı. Damarlar sayılırken lümen oluşturup oluşturmamalarına bakılmaksızın, tek bir endotel hücresi veya küçük endotel hücre toplulukları ve lümeni 50 μ m çapından büyük olmayan (8-10 taneden fazla eritrosit içermeyen) damarlar da sayıma dahil edildi. Diğerlerinden tam olarak ayırt edilemedikçe, dallanmalı yapılar tek damar olarak sayıldı. Bu alanların ortalaması ile elde edilen değer, vaka için MVD değeri olarak kabul edildi (28).

Çizelge 3.1. Kullanılan antikorların özellikleri

	MARKA	KODU	KESİT	DİLÜSYON
HIF-1 α	Santa Cruz	SC-8711	Frozen	1:2500
TSP-1	Santa Cruz	SC-12312	Frozen	1:200
VEGF	Santa Cruz	SC-507	Frozen	1:200
c-ras	Neo Markers	RB-1627-P1	Parafin	1:250
CD 34	Santa Cruz	SC-7045	Parafin	1:500

3.3. İstatistiksel analizler

Veriler Statistical Package for Social Science (SPSS) istatistik paket programı (10.0 sürüm) ile analiz edildi (SPSS for Windows, U.S.A.). Gruplar arasındaki farkların sayısal ölçümleri için Bonferroni düzeltmesi ile Mann-Whitney U testi, Kruskal-Wallis varyans analizi ve Spearman rank korelasyon testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

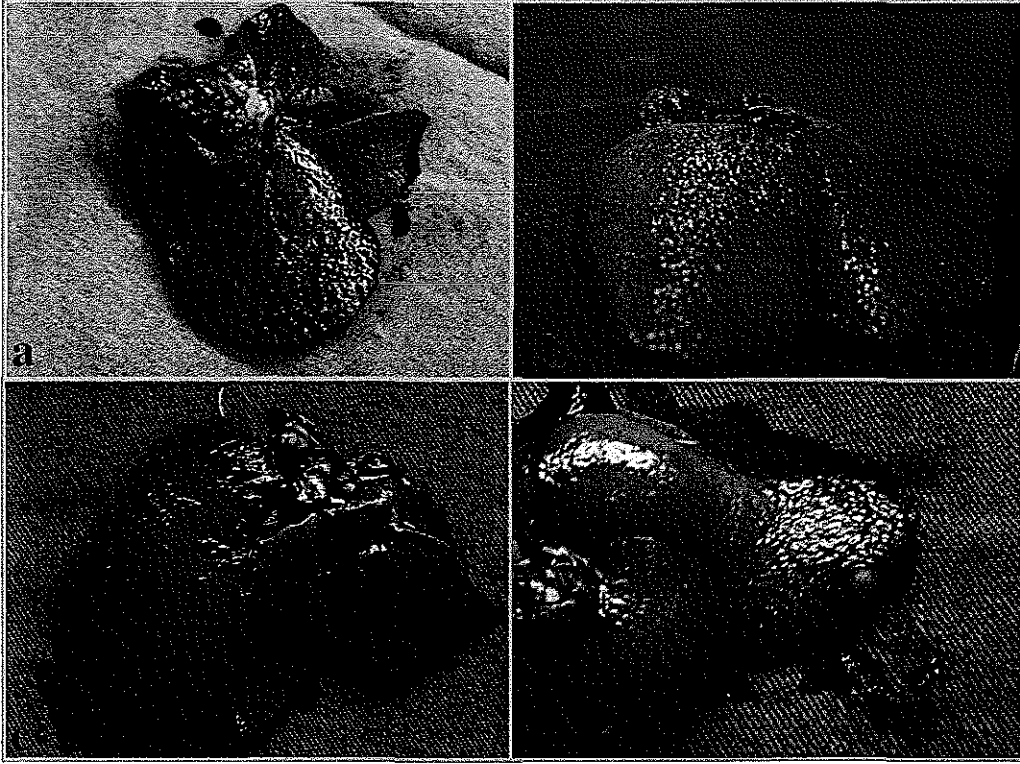
Bu çalışmada deney grubunu oluşturan toplam 29 adet erişkin Wistar rat haftada bir intraperitoneal olarak verilen toplam DENA enjeksiyonu sayısına göre 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (Grup 1(n=8)) 10 hafta boyunca intraperitoneal yolla serum fizyolojik verildi. Her bir rat son enjeksiyonlarından 2 hafta sonra sakrifiye edildi. Deney planı Çizelge 4.1'de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 4.1. Deney planı.

HAFTALAR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Grup 1 (n:8)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Grup 2 (n:4)	■	■								
Grup 3 (n:5)	■	■	■	■						
Grup 4 (n:5)	■	■	■	■	■					
Grup 5 (n:5)	■	■	■	■	■	■				
Grup 6 (n:5)	■	■	■	■	■	■	■	■		
Grup 7 (n:5)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

○ %0,9'luk NaCl, ■ 100mgr/kg intraperitoneal DENA

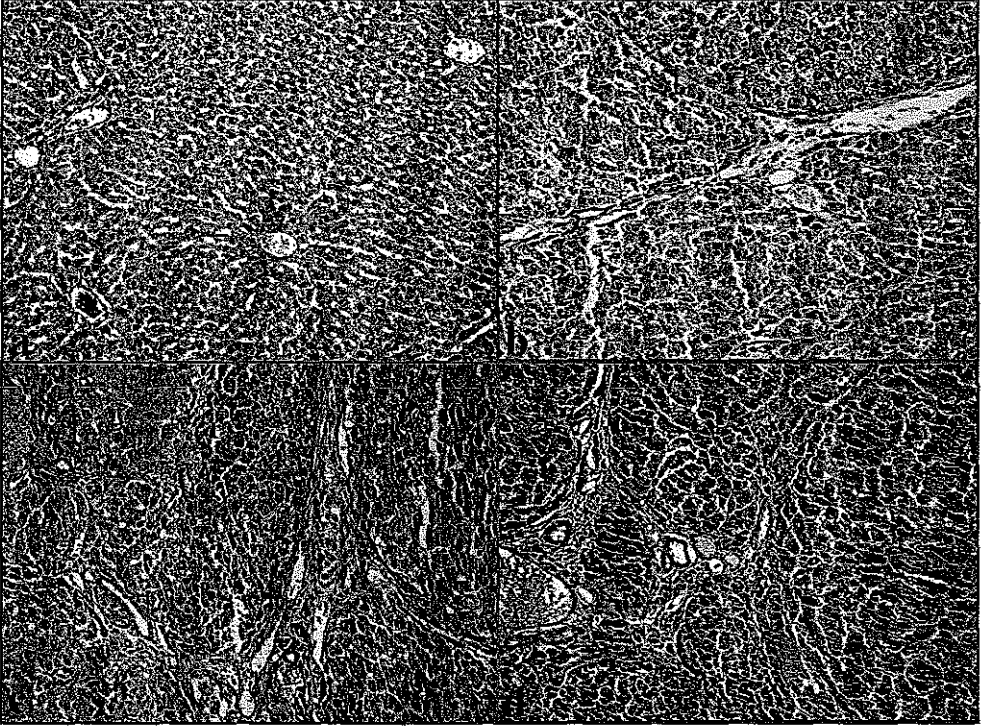
Sakrifiye edilen ratlardan elde edilen karaciğer dokularında makroskopik olarak kontrol grubunda herhangi bir patoloji izlenmezken, özellikle 6. ve 7. Gruplarda karaciğerin normal yapısını kaybederek ince fibröz bantlar ile küçük nodüllere ayrıldığı görüldü (**Şekil 4.1.**).



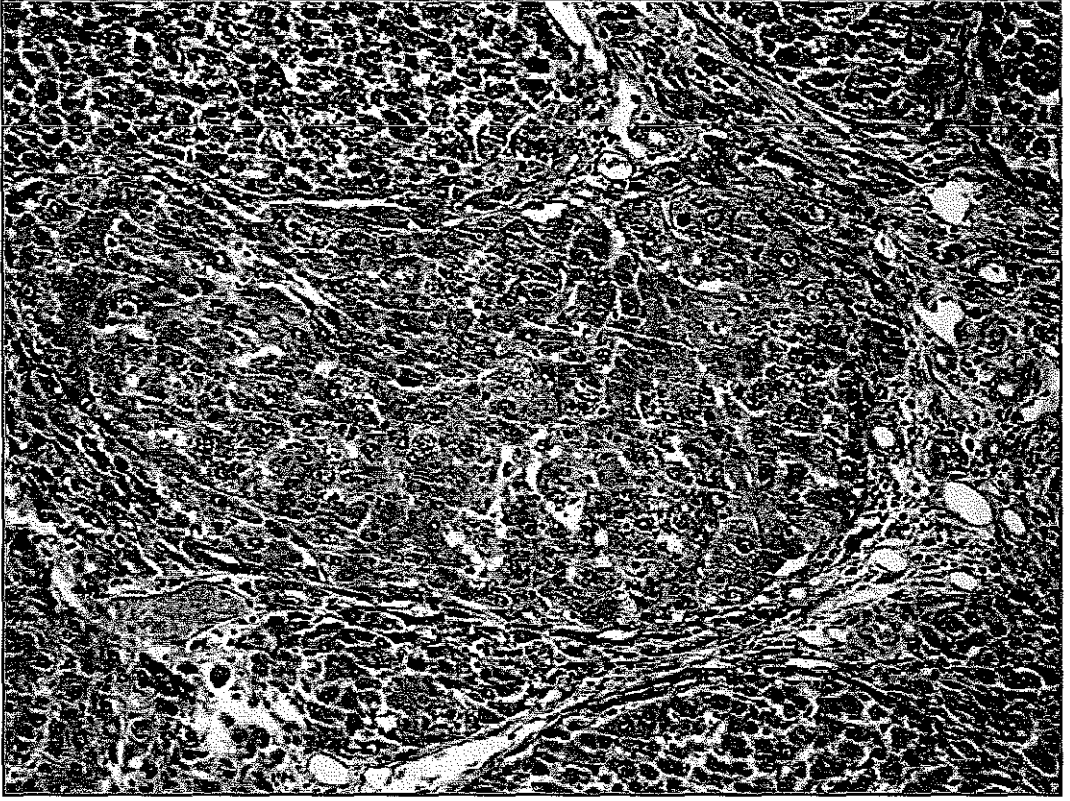
Şekil 4.1. Altıncı grupta (a ve b) ve 7. grupta (c ve d) karaciğer yüzeyinde izlenen ince fibröz bantlar ve nodüller.

Karaciğer dokularının hematoksilien-eosin boyama yöntemi ile yapılan mikroskopik incelemesinde; kontrol grubunun tümünde normal yapılanmanın korunduğu izlendi (**Şekil 4.2a.**). Fibrojenin 4. ve 5. gruplarda portal alan genişlemesi ve fibröz bantlar şeklinde ortaya çıktığı görülürken (**Şekil 4.2b**), 6. ve 7. gruplarda daha belirginleşerek normal yapıyı ortadan kaldırdığı, 7. grupta rejeneratif nodüllerin oluştuğu görüldü (**Şekil 4.2. c ve d**).

7.Grupta karaciğerde izlenen diffüz nodülasyona ek olarak bazı nodüller içerisinde yer alan hepatositlerde nükleuslarda pleomorfizm, kromatin kondansasyonu ve sitoplazmada eozinofili ile karakterli displastik değişiklikler izlendi (**Şekil 4.3.**)



Şekil 4.2. Hematoksilen-Eozin boyama yönteminde histopatolojik bulgular. 6. ve 7. gruplarda bağ dokusu gelişimine eşlik eden damarlanma belirgindir. [a: kontrol grubu (x50); b: 5. Grup (x100); c: 6. Grup (x100); d: 7. Grup(x100)]



Şekil 4.3. Yedinci grupta nodüllerin birinde izlenen displastik değişiklikler.

Tüm gruplarda izlenen MVD ile VEGF, HIF-1 α , TSP-1 ve c-ras boyanma yüzdelerine ait ortalama, median, minimum ve maksimum sırasıyla Çizelge 4.2., Çizelge 4.3., Çizelge 4.4., Çizelge 4.5. ve Çizelge 4.6.da belirtilmiştir.

MVD'nin ilerleyen haftalar boyunca oluşan fibrojeneze paralel olarak arttığı ve özellikle fibrojenезin belirginleştiği 5. grup ve üzerindeki gruplarda MVD'nin genel ortalamasının üzerinde olduğu dikkati çekti. MVD'nin kontrol ve diğer grup değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$). Kontrol grubu dışındaki gruplardan Grup 2, 3, 4 ve 5 arasında MVD (=MDS, mikrodamar sayısı) değerleri

açısından fark izlenmezken diğer gruplar arasındaki fark belirgindi ($p < 0.05$) (**Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7.**)

VEGF boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında sadece grup 3 ve 4 arasında fark bulunamadı. Diğer grupların karşılaştırılmasında ise grup değerleri arasındaki fark anlamlıydı ($p < 0.05$) (**Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.**)

VEGF ve HIF-1 α 'nın özellikle fibrogenezin bulunmadığı gruplarda santral venler çevresinde sınırlı olarak eksprese edildiği izlenirken fibrogenezin bulunduğu ve yoğun olduğu gruplarda santral ven çevresinden portal mesafeye doğru yönelim gösterecek biçimde pozitiflik gösterdiği izlendi (**Şekil 4.10 ve 4.11**)

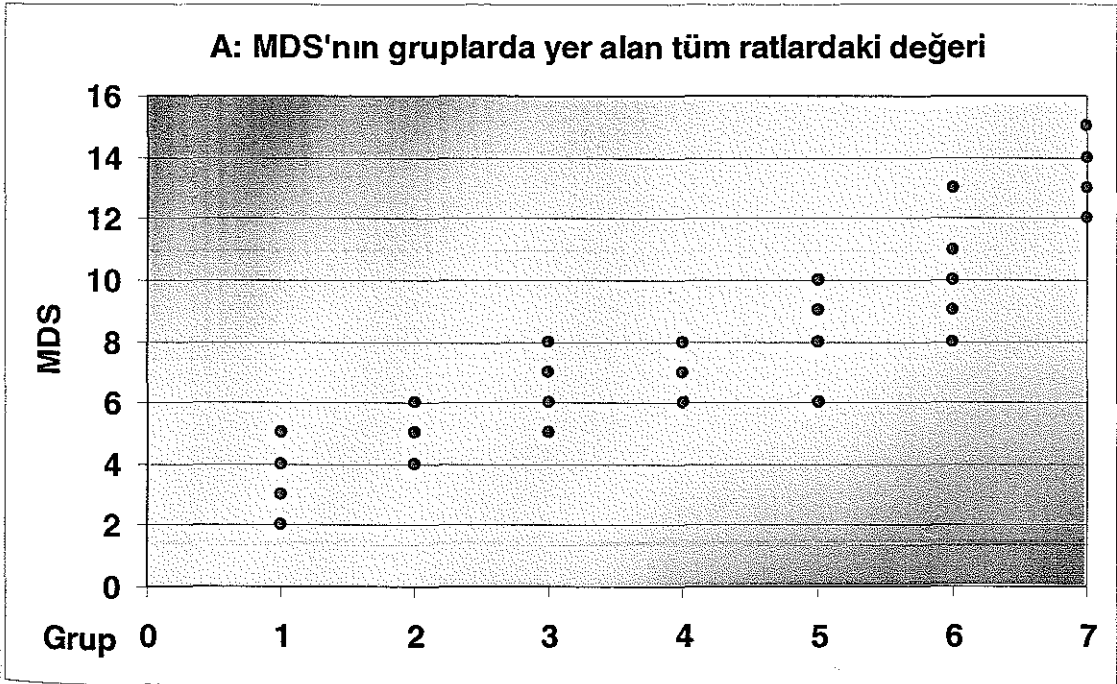
HIF-1 α boyanma yüzdeleri incelendiğinde 2. ve 3. gruplar arasında fark izlenmezken diğer tüm grupların değerleri birbirinden belirgin olarak farklıydı ($p < 0.05$) (**Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13**).

TSP-1 ile kontrol grubu ile 2. ve 3. gruplarda boyanma izlenmedi. Dördüncü grup ile 2. ve 3. grup arasında fark izlenmezken diğer gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$) (**Şekil 4.14., 4.15 ve 4.16**).

c-ras ile tüm gruplarda boyanma izlendi. Özellikle hepatositlerin sitoplazmasında pozitiflik dikkati çekti. Bazı kesitlerde pozitifliğin periportal hepatositlerde baskın olduğu izlendi. Diğer parametrelere benzer olarak c-ras boyanmasında da ilerleyen haftalar boyunca boyanma yüzdesinde bir artış izlenmesine karşın sadece kontrol grubu ile diğer gruplar arasında ve 6. ile 7. gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (**Şekil 4.17. ve 4.18**).

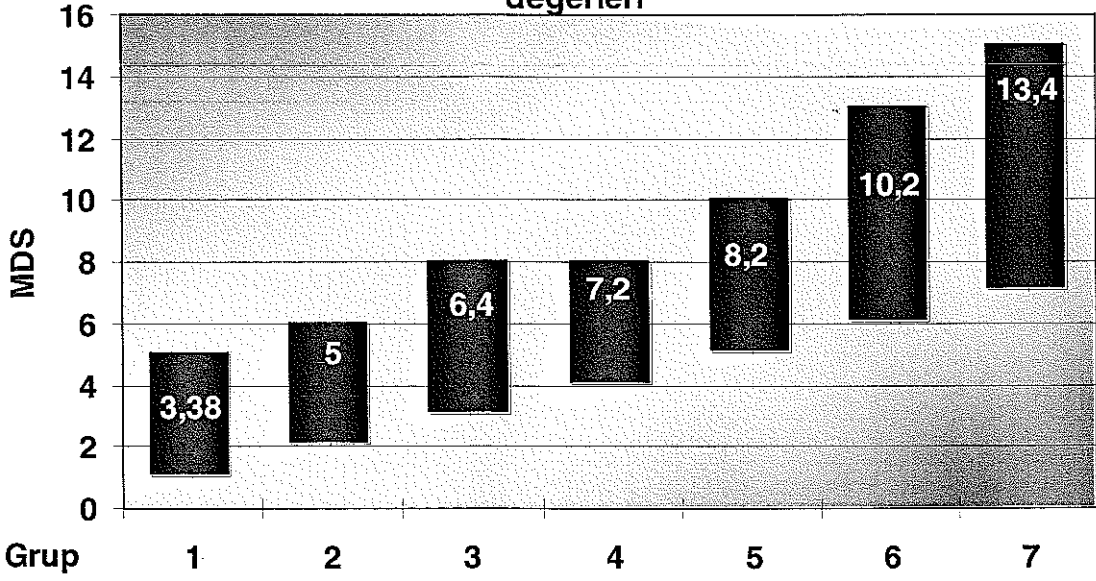
Çizelge 4.2. CD 34 ile belirlenen mikrodamar yoğunluklarının (MVD) gruplara göre istatistiksel değerleri.

MVD				
	Ortalama±SD	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1 (n:8)	3.38±1.19	3	2	3
Grup 2 (n:4)	5±0.82	5	4	6
Grup 3 (n:5)	6.40±1.14	6	5	8
Grup 4 (n:5)	7.20±0.84	7	6	8
Grup 5 (n:5)	8.20±1.48	8	6	10
Grup 6 (n:5)	10.20±1.92	10	8	13
Grup 7 (n:5)	13.40±1.14	13	12	15
Total	7.41±3.45	7	2	15

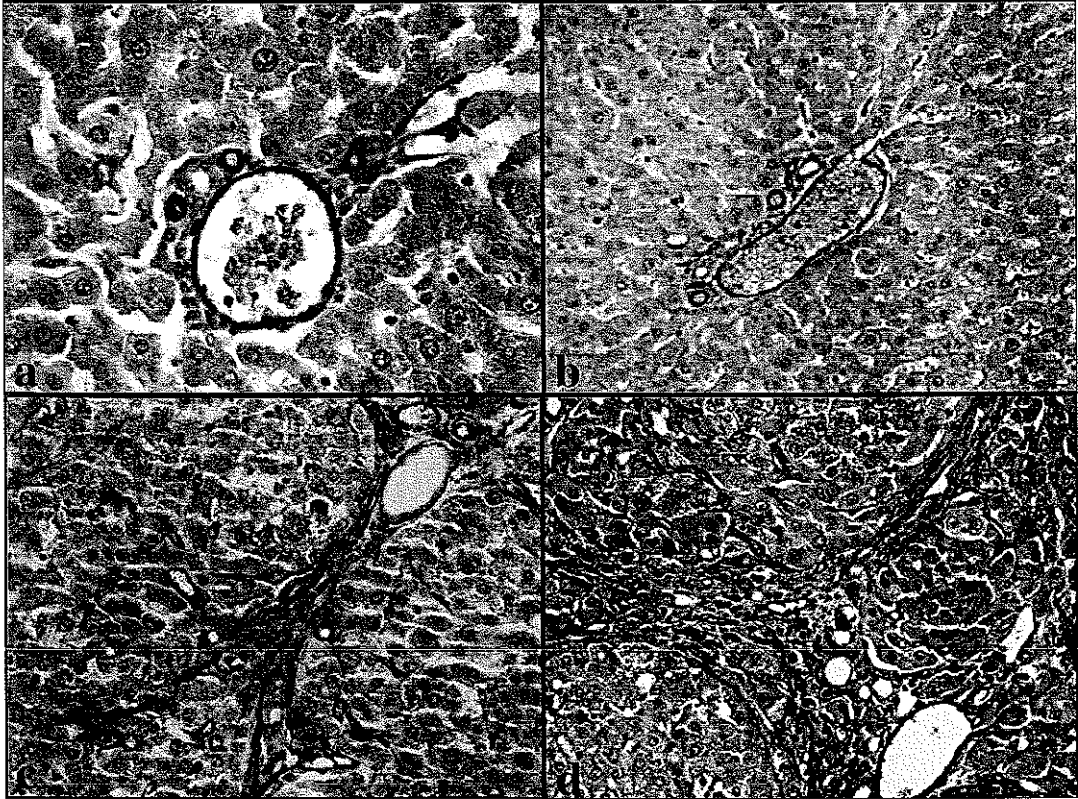


Şekil 4.4. Gruplara göre MVD değerleri

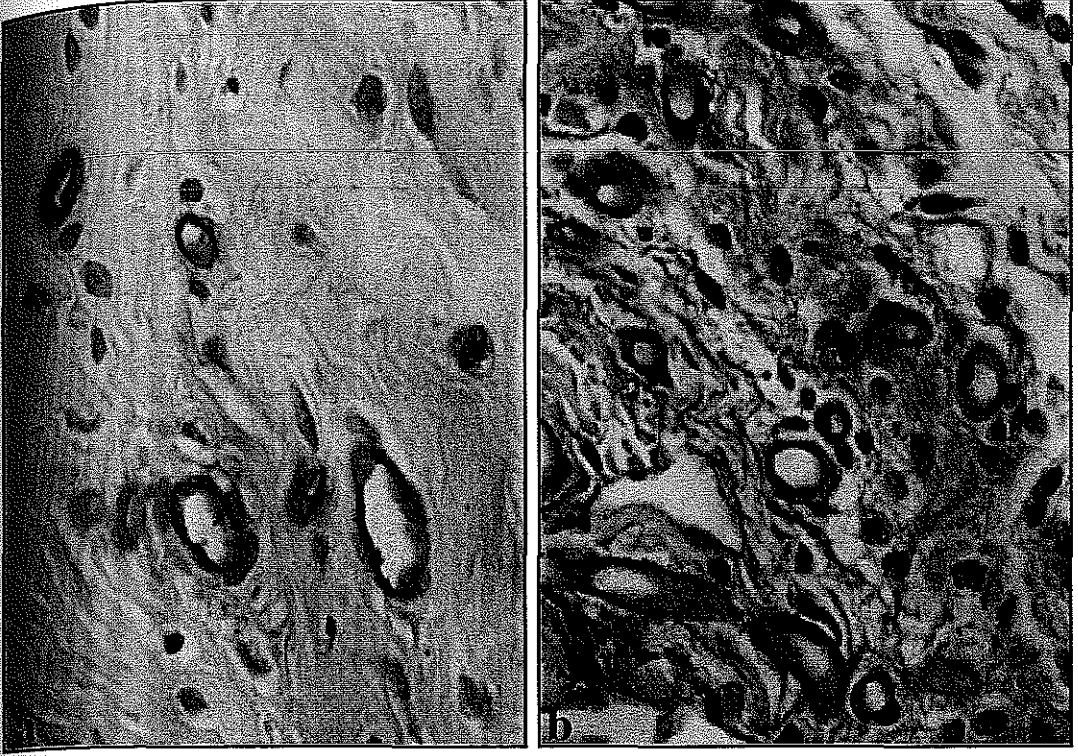
B: MDS'nin gruptaki ortalama, minimum ve maksimum değerleri



Şekil 4.5. Gruplara göre MVD'nin istatistiksel değerleri.



Şekil 4.6. Damarlarda CD34 pozitifliği. Kontrol grubu (a)X200, 3. grup (b) X100, 5. grup (c)x100 ve 7. grupta (d) x 100.

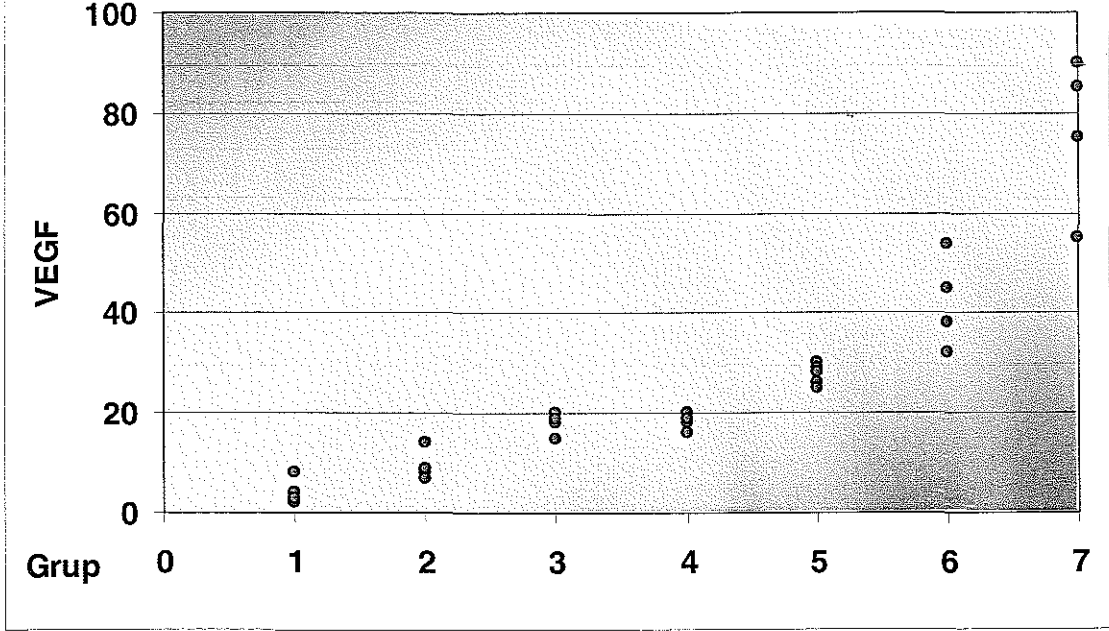


Şekil 4.7. Kontrol grubunda ve 7. grupta bağ dokusu içerisindeki damar yapılarında CD34 pozitifliği (x400).

Çizelge 4.3. Gruplarda VEGF boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri.

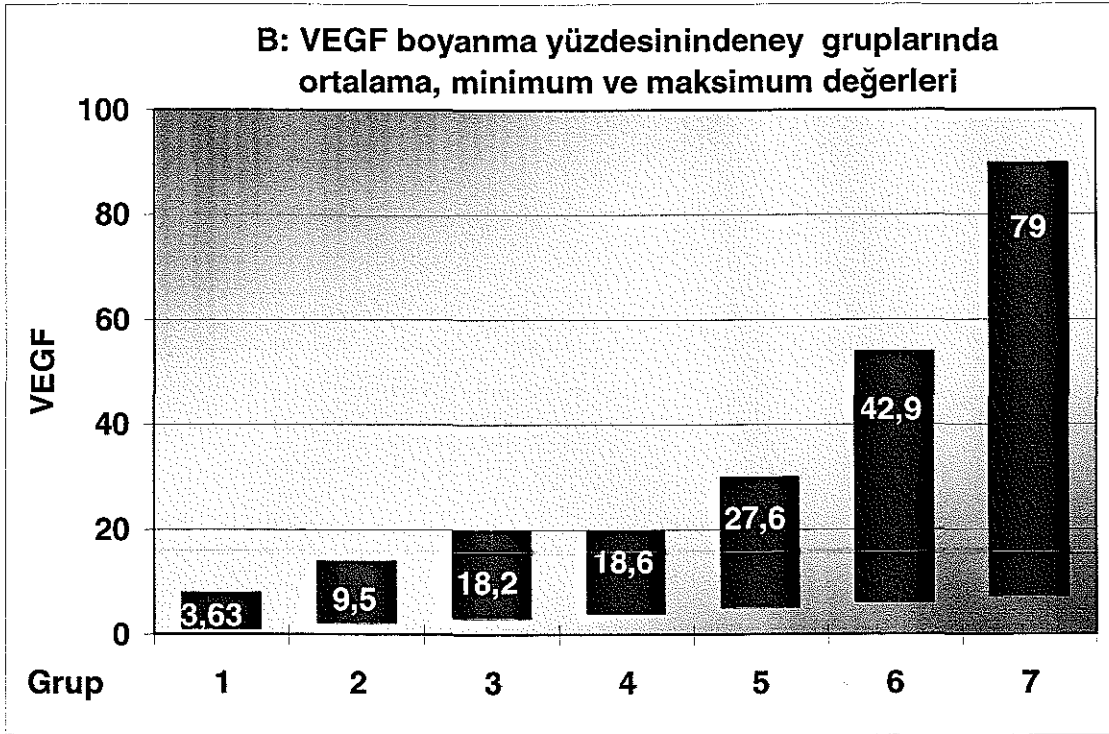
	VEGF(%)			
	Ortalama±SD	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1 (n:8)	3.63±1.85	3	2	8
Grup 2 (n:4)	9.50±3.11	8.50	7	14
Grup 3 (n:5)	18.20±1.92	19	15	20
Grup 4 (n:5)	18.60±1.67	19	16	20
Grup 5 (n:5)	27.60±2.07	28	25	30
Grup 6 (n:5)	42.80±8.29	45	32	54
Grup 7 (n:5)	79±14.75	85	55	90
Total	26.97±24.91	19	2	90

A: Tüm deneklerde VEGF'ün boyanma yüzdesi

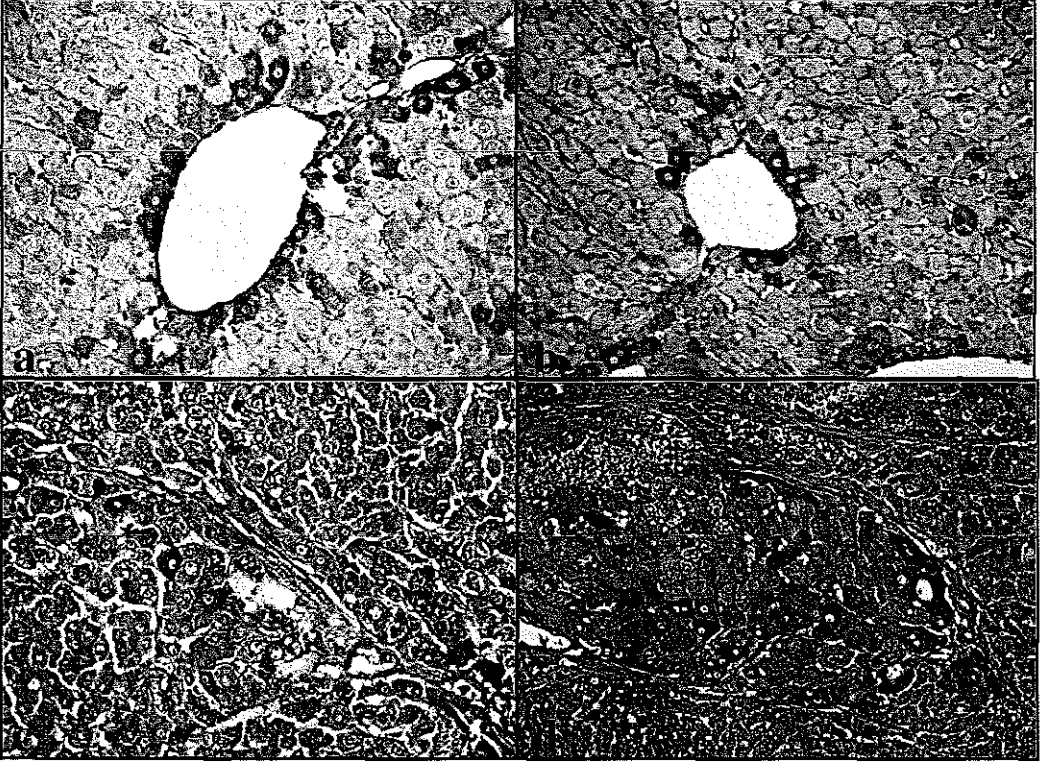


Şekil 4.8. Gruplara göre VEGF boyanma yüzdeleri.

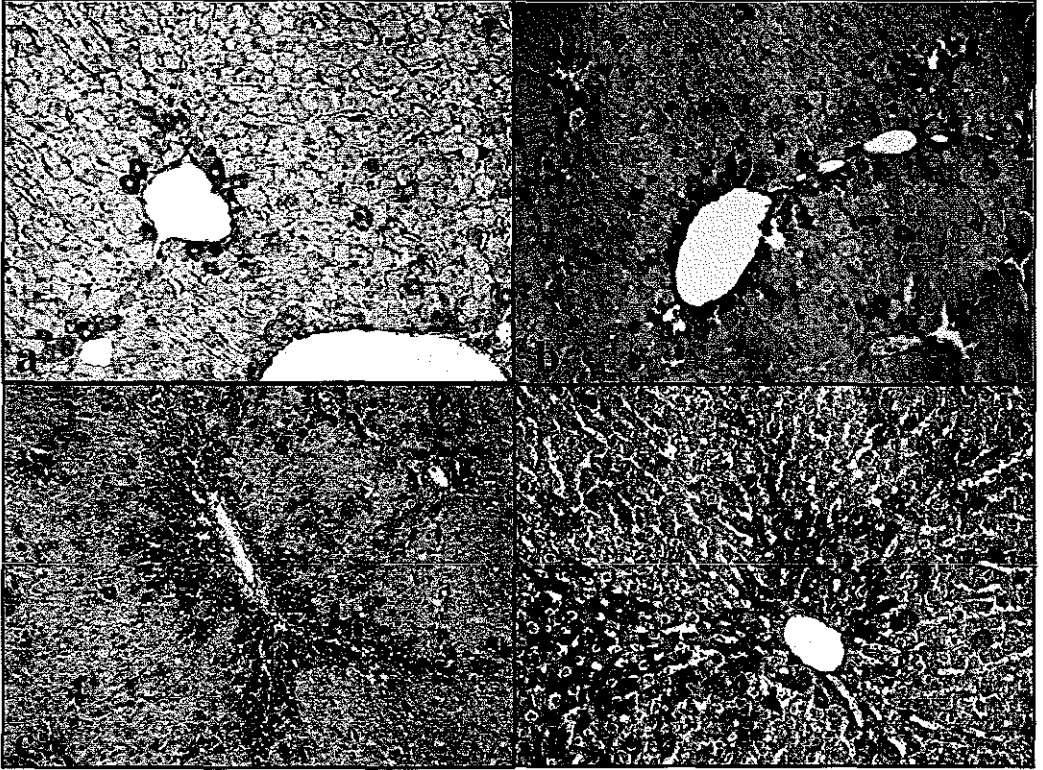
B: VEGF boyanma yüzdesinin deney gruplarında ortalama, minimum ve maksimum değerleri



Şekil 4.9. Gruplara göre VEGF boyanma değerleri.



Şekil 4.10. Kontrol (a), 3. grup (b), 5. grup (c) ve 7. grupta (d) VEGF boyanması (x200).

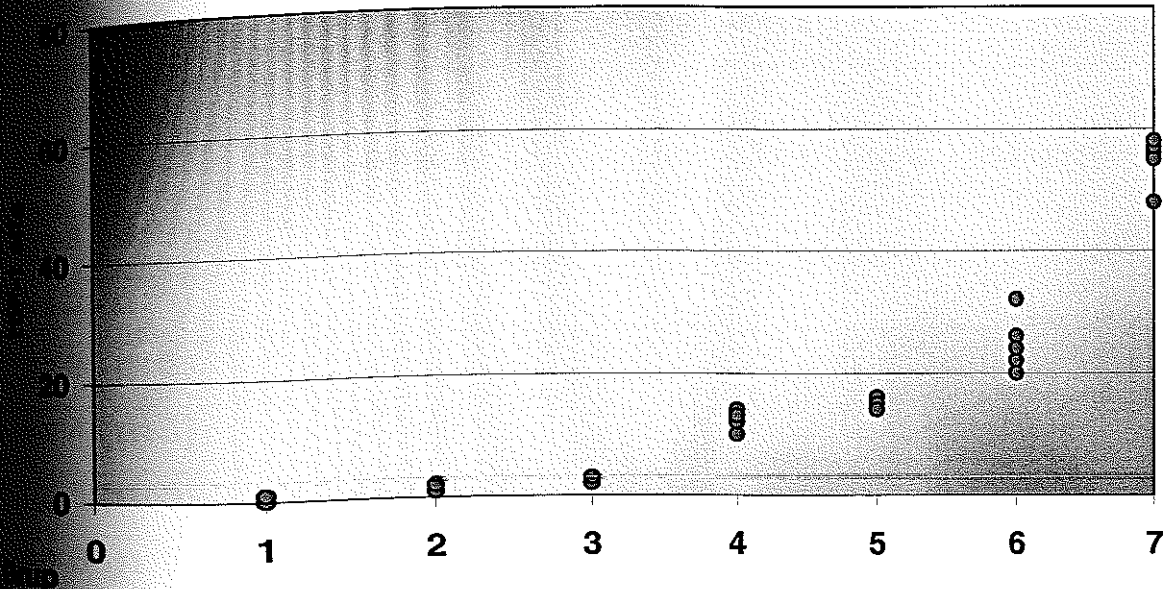


Şekil 4.11. Kontrol (a), 3. grup (b), 5. grup (c) ve 7. grupta (d) HIF-1 α boyanması (x100).

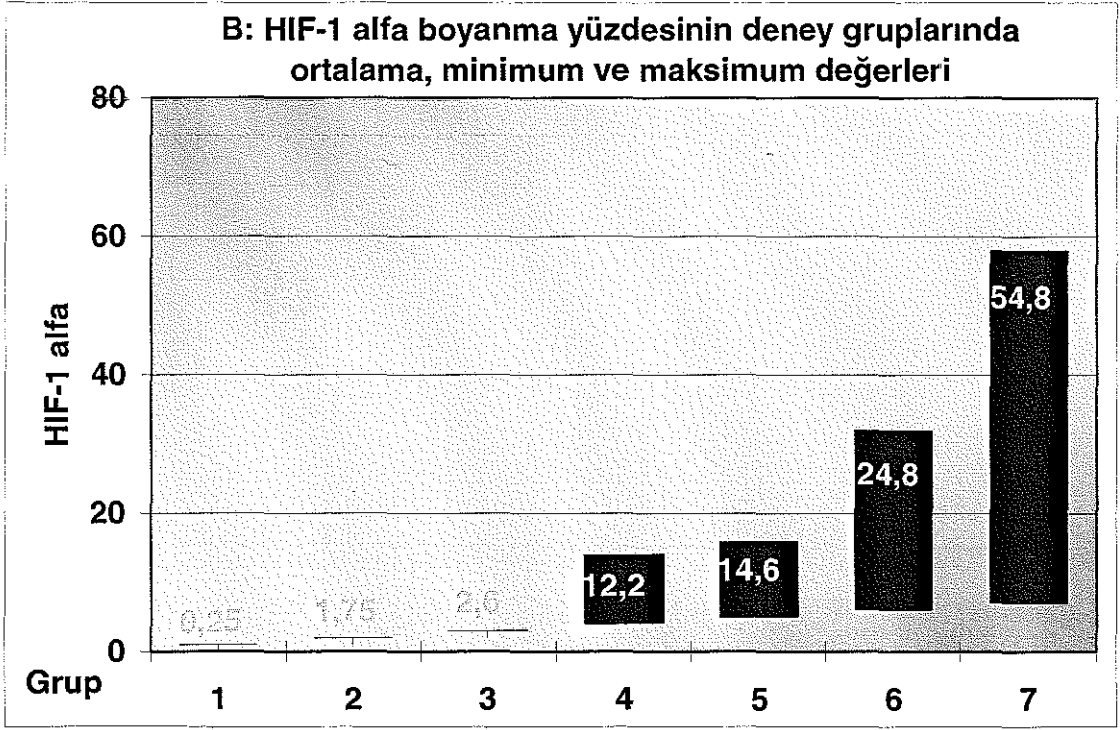
4.4. Gruplarda HIF-1 α boyanma yüzdelерinin ortalama değerleri.

	HIF-1 α (%)			
	Ortalama \pm SD	Median	Minimum	Maksimum
1 (n:8)	0.25 \pm 0.46	0	0	1
2 (n:4)	1.75 \pm 0.50	2	1	2
3 (n:5)	2.60 \pm 0.55	3	2	3
4 (n:5)	12.20 \pm 1.48	12	10	14
5 (n:5)	14.60 \pm 0.89	14	14	16
6 (n:5)	24.80 \pm 4.60	24	20	32
7 (n:5)	54.80 \pm 3.96	56	48	58
	14.97 \pm 18.12	12	0	58

A: Tüm deneklerde HIF-1 α 'nın boyanma yüzdesi



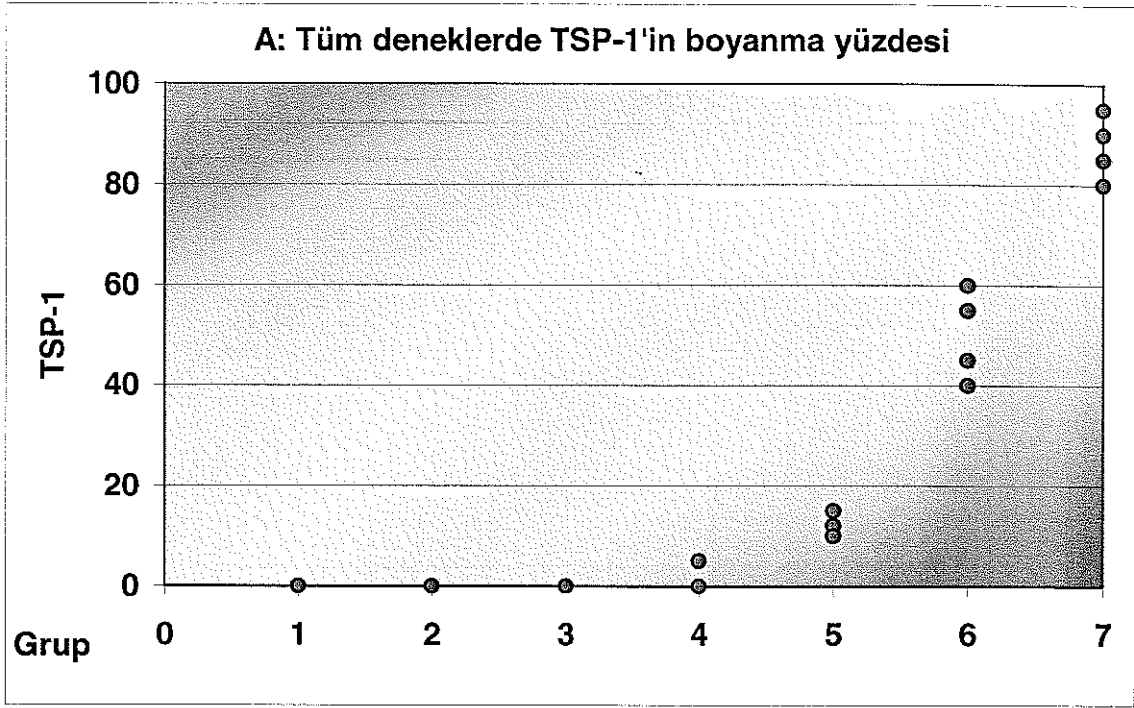
4.12. Gruplara göre HIF-1 α boyanma yüzdeleri.



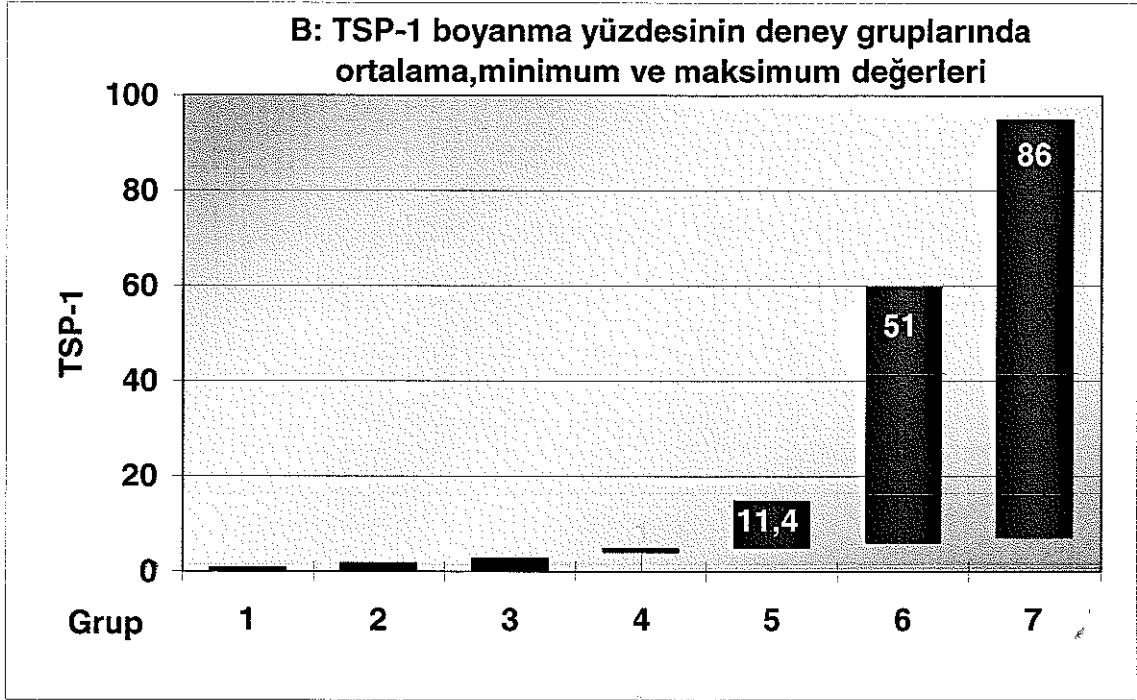
Şekil 4.13. Gruplara göre HIF-1 α boyanma değerleri.

Çizelge 4.5. Gruplarda TSP-1 boyanma yüzdelерinin istatistiksel değerleri.

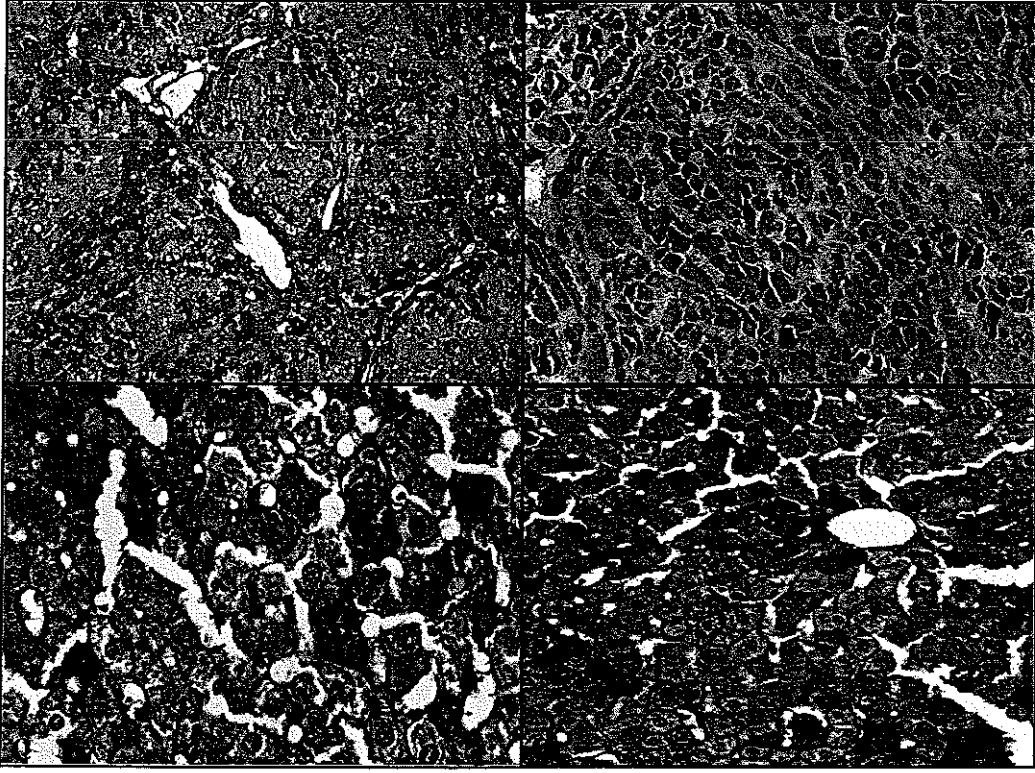
TSP-1				
	Ortalama \pm SD	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1 (n:8)	0	0	0	0
Grup 2 (n:4)	0	0	0	0
Grup 3 (n:5)	0	0	0	0
Grup 4 (n:5)	1 \pm 2.24	0	0	5
Grup 5 (n:5)	11.40 \pm 2.19	10	10	15
Grup 6 (n:5)	51 \pm 8.22	55	40	60
Grup 7 (n:5)	86 \pm 6.52	85	80	95
Total	20.19 \pm 31.64	0	0	95



Şekil 4.14. Gruplara göre TSP-1 boyanma yüzdeleri



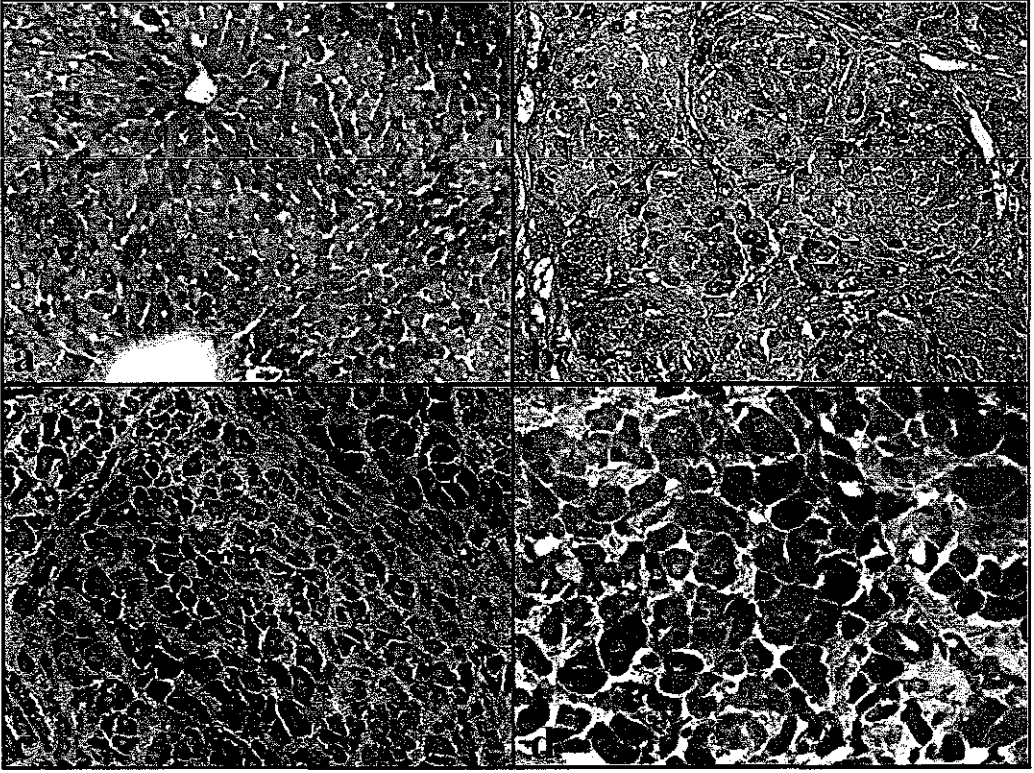
Şekil 4.15. Gruplara göre TSP-1 boyanma değerleri.



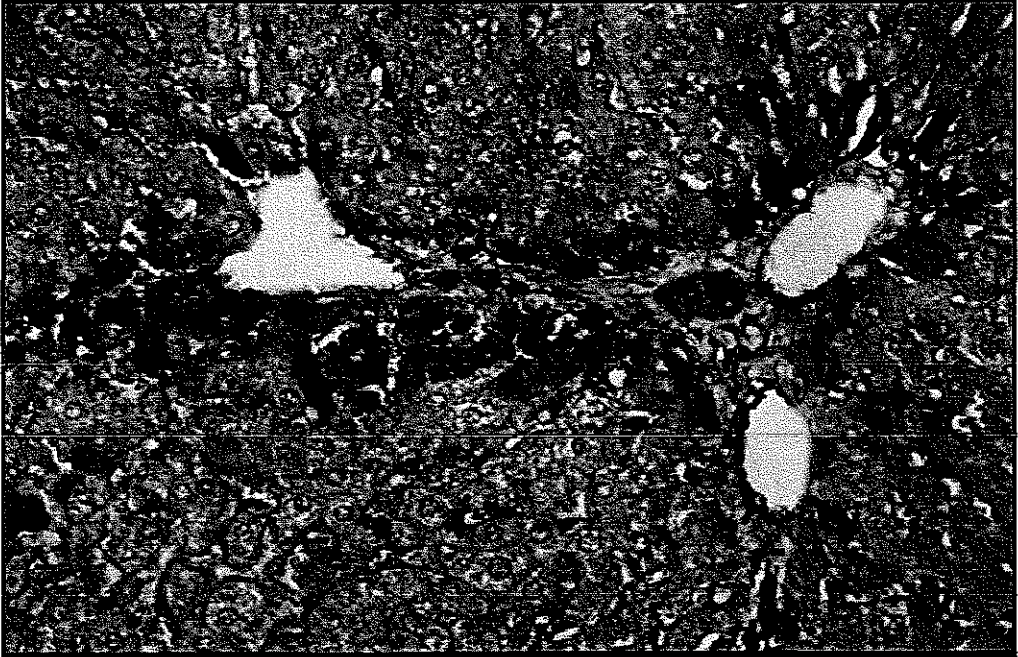
Şekil 4.16. Fibrogenezisin bulunduğu 4. grup (a,b x100) ve 7. grupta (c, d x400) TSP-1 pozitifliği.

Çizelge 4.6. Gruplarda c-ras boyanma yüzdelerinin istatistiksel değerleri.

c-Ras(%)				
	Ortalama±SD	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1 (n:8)	0.87±1.64	0	0	4
Grup 2 (n:4)	22.50±9.57	25	10	30
Grup 3 (n:5)	20±10	20	10	30
Grup 4 (n:5)	21±5.47	20	15	30
Grup 5 (n:5)	21±5.47	20	15	30
Grup 6 (n:5)	12±4.47	10	10	20
Grup 7 (n:5)	22±4.47	20	20	30
Total	15,59±10.10	20	0	30



Şekil 4.17. Fibrojenizisin bulunduğu 4. grup (a x100) ve 7. grupta (b x100; c, d x400) c-ras pozitifliği.



Şekil 4.18. Periportal hepatositlerde c-ras pozitifliği.

Çalışmada ele alınan parametrelerin grup ortalamaları ve istatistiksel anlamlılıkları ile ilgili veriler Çizelge 4.7.de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Gruplar arasında tüm parametrelerin ortalamaları ve karşılaştırmaları. Üst simge ile işaretli olanlar dışında gruplar arasındaki farklar anlamlıdır.

	MDV	VEGF(%)	HIF-1 α (%)	TSP-1(%)	C-RAS(%)
Grup 1	3.38 \pm 1.19	3.63 \pm 1.85	0.25 \pm 0.46	0	0.87 \pm 1.64
Grup 2	5 \pm 0.82*	9.50 \pm 3.11	1.75 \pm 0.50‡	0	22.50 \pm 9.57 [§]
Grup 3	6.40 \pm 1.14*	18.20 \pm 1.92 [†]	2.60 \pm 0.55‡	0	20 \pm 10 [§]
Grup 4	7.20 \pm 0.84*	18.60 \pm 1.67 [†]	12.20 \pm 1.48	1 \pm 2.24	21 \pm 5.47 [§]
Grup 5	8.20 \pm 1.48*	27.60 \pm 2.07	14.60 \pm 0.89	11.40 \pm 2.19	21 \pm 5.47 [§]
Grup 6	10.20 \pm 1.92	42.80 \pm 8.29	24.80 \pm 4.60	51 \pm 8.22	12 \pm 4.47
Grup 7	13.40 \pm 1.14	79 \pm 14.75	54.80 \pm 3.96	86 \pm 6.52	22 \pm 4.47

* p>0.05 ; † p>0.05 ; ‡ p>0.05; § p>0.05

Spearman-rank korelasyon testinde tüm değişkenler arasında kuvvetli bir ilişki olduğu görüldü (**Çizelge 4.8**).

Çizelge 4.8. Çalışmadaki parametrelerin Spearman-rank korelasyon testi ile saptanan r değerleri.

	VEGF(%)	HIF-1 α (%)	TSP-1(%)	C-RAS(%)
MDV	0.916	0.917	0.834	0.435
VEGF(%)		0.969	0.887	0.477
HIF-1 α (%)			0.899	0.441
TSP-1(%)				0.223*

* p>0.05. Diğer tüm değerler için p<0.01

5. TARTIŞMA

Sirozun gelişiminin en önemli ögesi fibrogenezisdir ve geçmişte yapılan çalışmalarda anjiyogenez ile ilişkisi gösterilmiştir (6,7,8,9). Oluşan anjiyogenezin hipoksi ile indüklendiğine dair çok sayıda kanıtlar vardır. Bazı bulgular hipoksi ile indüklenerek anjiyogenezi düzenleyen faktörlerin dolaylı olarak fibrozisi etkilediğine işaret etmektedir. Biz de bu amaçla çalışmamızda deneysel karaciğer fibrozisi boyunca oluşan anjiyogenezi kantitatif olarak belirleyip hipoksi ve anjiyogenez ile ilişkili olan faktörlerden HIF-1 α , VEGF, TSP-1 ve c-ras ekspresyonu ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda ilerleyen haftalar boyunca oluşan fibrogenezis ile anjiyogenezin (MVD) ilişkili olduğunu saptadık. Verilerimize göre kontrol grubu ile fibrozisin tam olarak gelişmediği 2., 3. ve 4. gruplarda MVD, fibrozis izlenen gruplardan oldukça düşük seviyede olup gruplar arası farkların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu izlendi ($p < 0,05$). Önceki çalışmalarda anjiyogenez ile fibrozis arasındaki paralellik saptanmış olsa da bilgilerimize göre objektif olarak küçük damar sayımı ile fibrozis arasındaki ilişki araştırılmamıştır ve çalışmamızın sonuçları bu ilişkiyi ortaya koymaktadır.

Deney grubumuzda VEGF boyanma yüzdesinin fibrozis artışına paralel olarak arttığı ve hem MVD hem de diğer parametreler ile arasında pozitif bir ilişki olduğu görülmüştür. Bilindiği gibi VEGF en potent anjiyogenik faktörlerden biridir ve ratlarda parsiyel hepatektomi sonrasında VEGF ekspresyonunun rejenerasyonu indüklediğini gösterilmiştir (63). Corpechot ve ark. (2), DENA ile oluşturdukları deneysel siroz

rat karaciğerlerinde VEGF ve Kollajen I ekspresyonunu artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada hepatositler ile sınırlı iken (hepatositlerin yaklaşık % 3'ü), sirotik karaciğerde hepatositlerin % 90'ından fazlasında VEGF ekspresyonu tespit edilmiştir. Yazarlar Kollajen I ekspresyonunu da göz önüne alarak hipoksinin kronik karaciğer hastalıklarında hem anjiyogenez hem de fibrogenez üzerinde etkili olabileceğini savunmuşlardır. Rosmorduc ve ark. (6) ise deneysel model üzerinde biliyer siroz oluşturdukları ratlarda; hepatositlerde VEGF ve FGF-2 ekspresyonunu incelemişlerdir. Normalde perivenüler yerleşimli 1-2 sıra hepatositlerde izlenen VEGF ve FGF-2 ekspresyonunun safra kanalı ligasyonundan 7 hafta sonra siroz gelişimi ile beraber hepatositlerin % 100'ünde eksprese edildiğini göstermişlerdir. Ishikawa ve ark. (11) karbon tetraklorür entoksikasyonundan 24 saat sonra hepatik VEGF mRNA ekspresyonunun arttığını ve 168. saatte hücre nekrozu ortadan kalkarken ekspresyonunu baskın hale geldiğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da VEGF ekspresyonu; kontrol grubunda -normalde karaciğerin en hipoksik alanı olan- perivenüler alanda sınırlı hepatositlerin ortalama % 3'ünde izlenmiştir. 7.Grupta yani vaskülarize fibröz septaların izlendiği sirotik karaciğerde ise; VEGF ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstererek ($p < 0,05$) hepatositlerin ortalama % 79'unda pozitif bulunmuştur. Bu artışı CD34 ile belirlenen MVD ile koreledir. Sonuç olarak verilerimiz literatür ile uyumlu olup VEGF ekspresyonunun anjiogenez ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda VEGF ekspresyonu hepatosit sitoplazmalarında güçlü pozitiflik şeklinde izlenmiştir. Bazı çalışmalarda ise VEGF mRNA ekspresyonu hepatositlerin yanı sıra Kupffer hücrelerinde ve yıldız hücrelerde de izlenmiştir (11). Bizim çalışmamızda ise hepatositler dışındaki hücrelerde ekspresyon izlenmemiştir. Bu farkın nedeni çalışmalar arasındaki yöntem farklılıklarına bağlı olabilir.

VEGF'ün ekspresyonunu regüle eden faktörlerden biri de HIF-1 α 'dır. HIF-1 α ekspresyonunun anjiyogenez ve VEGF gibi diğer anjiyogenez düzenleyici faktörler ile ilişkisi karaciğerin malign tümörlerinde araştırılmış olmasına karşın bilgilerimize göre deneysel olarak oluşturulmuş fibrojen ve siroz gelişimindeki rolü henüz bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda 2. ve 3. gruplar dışında, HIF-1 α boyanma yüzdesinin ortalamaları tüm gruplarda anlamlı farklılıklar göstermiştir. Dahası hem VEGF hem de diğer anjiyogenez ile ilişkili parametreler ile güçlü bir ilişki göstermektedir. HIF-1 α hipoksi ile aktive olarak VEGF'ün transkripsiyonunu indüklemektedir. Dolayısıyla karaciğerde oluşan fibrojenize eşlik eden anjiyogenezin oluşumunda HIF-1 α 'nın VEGF ekspresyonunu artırarak etki ettiği düşünülebilir. Ayrıca hem HIF-1 α hem de VEGF hipoksik şartlarda aktive olduklarından verilerimiz karaciğer fibrojenizi ile hipoksi arasındaki ilişkiye de işaret etmektedir. Ancak bulgularımızın ileride yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

TSP-1'in yara iyileşmesi ve tümör büyümesi sırasında anjiyogenezin regülasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir. TSP-1 temel olarak anti-anjiyogenik olarak kabul edilse de potent

proanjiogenik etkisinin olabileceğine dair kanıtlar vardır. Örneğin; hepatosellüler karsinomlarda TSP-1 ekspresyonunun VEGF ile korele olduğu gösterilmiş ve TSP-1'in VEGF ile anjiyogenezi indüklediği öne sürülmüştür. Literatürde karaciğerde fibrojeniz boyunca TSP-1 ekspresyonunun incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda TSP-1 ekspresyonu, fibrojenizin bulunmadığı ve MVD'nin düşük olduğu kontrol grubu, 2. ve 3. grupta izlenmedi. Ayrıca fibrojenizin hafif olduğu 4. grupta boyanma yüzdesinin %1 olduğu görüldü. Buna karşın fibrojenizin gittikçe arttığı 5., 6. ve 7. grupta sırasıyla %11.4, %51 ve %86 oranında izlendi. Ayrıca MVD, HIF-1 α ve VEGF ile arasında güçlü bir ilişki olduğu görüldü. Her ne kadar ileride geniş serilerde yapılacak çalışmalar ile desteklenmesi gerekse de bulgularımız deneysel karaciğer fibrojenizinde oluşan anjiyogeneizde TSP-1 ekspresyonunun, HIF-1 α ve VEGF ile bağlantılı olarak rol aldığını göstermektedir.

Çalışmamızda c-ras ekspresyonu kontrol grubu ile diğer gruplar arasında farklılık göstermiş olmasına karşın 6. ve 7. grup dışında diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ek olarak çalışmada kullanılan diğer parametreler ile c-ras ekspresyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır. Geçmiş yıllarda sirotik karaciğerlerde ras ekspresyonu araştırılmıştır. Liu ve ark. (24) ; 11 siroz vakası üzerinde yaptıkları çalışmada in situ hibridizasyon yöntemi ile proto-onkogenlerden c-jun, c-fos ve c-H-ras düzeylerini incelemişlerdir. Kontrol grubundaki normal karaciğer dokularında pozitif bulgu izlemezken, siroz olgularının

6. ve 7. grupta sirotik nodülleri oluşturan hepatositlerin hemen hemen tümünde c-H-ras mRNA ekspresyonunu göstermişlerdir. Zhang ve ark. (49) ise c-N-ras mRNA düzeylerinin, Haritani ve ark. (50) çalışmaları gibi c-Ki-ras mRNA düzeylerinin sirotik karaciğer dokusunda anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Yine sirozda p21 ras onkoproteini de hepatositlerde %87 (47) ve % 94 (48) oranında gösterilmiştir. Sirotik karaciğer dokusunda ras p21 antijenini pozitif olarak değerlendirirken normal karaciğer dokusunda negatif bulmuşlardır. Sirotik karaciğer dokusunda ras p21 antijenini pozitif olarak değerlendiren çalışmaların çoğunda Reif ve ark. (25); tioasetamid ile siroz oluşturdukları ratlara 12 hafta boyunca ras antagonisti olan mesiltiosalisilik asit(FTS) vermişlerdir. Histopatolojik olarak siroz ve yangı skorlarında azalma tesbit etmişlerdir. Aynı çalışmada sadece tioasetamid alan ratlarda Western blot tekniği ile ras düzeyinde artış izlerken; beraberinde FTS verilen ratlarda ras düzeylerinde anlamlı derecede azalma olduğunu bildirmişlerdir. Karaciğer fibrogenezi boyunca ras ekspresyonunun inhibisyonunun deneysel olarak siroz gelişimini engellediği sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızın sonuçları ise fibrogenez ile c-ras onkogen ekspresyonunun arttığını göstermekle birlikte ne anjiyogenez ne de anjiyogenezle ilişkili faktörler ile c-ras ekspresyonu arasında bir ilişki gösterilememiştir. Solid organ tümörlerinde TSP-1 ile c-ras ekspresyonu arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiş olsa da çalışmamızda böyle bir ilişki saptanmamıştır.

6. ve 7. gruptaki c-ras onkogen ekspresyonundaki anlamlı farklılık ise anjiogenezden çok deney grubu

SONUÇLAR

Çalışmamıza toplam 37 adet erişkin Wistar rat dahil edildi. Ratlardan kontrol grubu (1.Grup) oluşturan 8 tanesine haftada bir intraperitoneal yol ile %0,9 NaCl (serum fizyolojik) verildi. Geri kalan 29 rat haftada bir intraperitoneal DENA verilmek üzere toplam DENA enjeksiyon sayısına göre 6 gruba ayrıldı. Ratlar son enjeksiyondan 2 hafta sonra sakrifiye edilerek karaciğer dokuları elde edildi. Histopatolojik incelemede ilerleyen haftalar boyunca gelişen fibrogeneze ile ona eşlik eden anjiyogenez arasındaki ilişki; anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörlerin ekspresyonlarındaki farklılıklar değerlendirilerek açığa çıkarıldı. Anjiyogenezi değerlendirmek için tüm olgularda CD34 ile mikrodamar sayısı belirlendi ve belirtilen parametrelerle ile olan ilişkisine bakıldı.

Toplam 8 ve 10 kere DENA enjeksiyonu alan son iki grupta mikroskopik incelemede karaciğerde diffüz nodülasyonların geliştiği ve vaskülarize fibröz septaların varlığı, yani siroz gelişimi dikkati çekti.

İlerleyen haftalar boyunca artan fibrogeneze paralel olarak anjiyogenezin geliştiğini; kontrol grubu ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren MVD değerleri ile gösterdik ($p < 0,05$). İkinci, 3., 4. ve 5. gruplar arasında ise MVD değerleri açısından anlamlı fark bulunamadı.

Çalışmaya dahil edilen ve en potent anjiyogenik faktörlerden biri olan VEGF'nin olgulardaki boyanma yüzdeleri karşılaştırıldığında sadece Grup 3 ve 4 arasında anlamlı fark

bulunamadı. Diğer grup karşılaştırmaları istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$).

HIF-1 α ile de benzer şekilde Grup 2 ve 3 arasında anlamlı fark görülmezken, diğer tüm gruplararası karşılaştırmalarda anlamlı fark tespit edildi.

TSP-1 ile kontrol grubu, 2. ve 3. grupta boyanma izlenmedi. Dördüncü grup ile 2. ve 3. grup arasında anlamlı fark izlenmedi. Diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$).

c-ras ile sadece kontrol grubu ile 6. ve 7. gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

MVD ile VEGF ve HIF-1 α arasında sırasıyla r değerleri 0,916 ve 0,917 olan güçlü bir korelasyon bulundu ($p < 0,05$). MVD ile TSP-1 arasındaki r değeri ise 0,834 olarak bulundu. MVD ile c-ras arasında güçlü bir korelasyon bulunamadı ($r = 0,435$). Yine VEGF ile HIF-1 α , VEGF ile TSP-1 boyanma yüzdeleri arasındaki korelasyon oldukça kuvvetli idi (sırasıyla $r = 0,969$ ve $0,887$). HIF-1 α ile TSP-1 arasında da güçlü bir korelasyon izlendi ($r = 0,899$).

7. ÖZET

Çalışmamızda ratlara intraperitoneal DENA verilerek fibrojeniz oluşturulmaya çalışılmış ve fibrojeniz evreleri boyunca eşlik eden anjiyogenez ile anjiyogenik faktörler olan VEGF, HIF-1 α , c-ras ile anti-anjiyogenik faktör olarak bilinen TSP-1 ekspresyonları arasındaki ilişki araştırılmıştır. Fibrojenize anjiyogenezin eşlik ettiğini ve ilerleyen haftalar boyunca anjiyogenez ile ilişkili faktörlerden VEGF, HIF-1 α ve TSP-1 ekspresyonlarının arttığını, özellikle VEGF ve HIF-1 α ekspresyonlarının MVD ile güçlü bir korelasyon gösterdiğini açığa çıkardık. Anti-anjiyogenik faktör olarak bilinen TSP-1'in de aynı şekilde artış göstermesini anjiyogenik faktörlerle arasında kurulan dengeyle ilgili olabileceğini veya DENA etkisi ile ortaya çıkan displastik değişikliklerin bir sonucu olabileceğini düşündük.

Sonuçta siroz gelişiminde ortaya çıkan fibrojenizin anjiyogenez ile birlikte ilerlediğini ve anjiyogenezde anjiyogenik faktörler yanı sıra TSP-1'de olduğu gibi anti-anjiyogenik olarak bilinen faktörlerin de rol aldığını gözlemledik. İleri çalışmalarla bu faktörlerin birbirleri ile olan ilişki mekanizmalarının anlaşılması ile fibrojeniz ve anjiyogenezini önlemeye yönelik yaklaşımlar ile sirozun önlenileceğini veya gelişiminin yavaşlatılabileceğini düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

- 1) Crawford JM. Liver cirrhosis. In: MacSween RNM, Burt AD, Portmann BC, Ishak KG, Scheuer PJ, Anthony PP (eds): Pathology of the liver. Elsevier Science Limited, China, 2002: pp 575-594.
- 2) Corpechot C, Barbu V, Wendum D. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. Hepatology 2002; 35:1010-1021.
- 3) Friedman S. Cytokines and fibrogenesis. Semin Liver Dis 1999; 19:129-140.
- 4) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis ,an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 2000; 275:2247-2250
- 5) Crawford JM. Karaciğer ve safra yolları. In :Robbins Temel Patoloji eds:Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, Nobel Tıp Kitabevi 2003 İstanbul pp:599.
- 6) Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C. Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. Am J Pathol 1999; 155:1065-1073.
- 7) Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med 1995; 333:1757-1763.
- 8) Nissen N, Polverini P, Koch A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol 1998; 152:1445-1452

- 9) Scheid A, Wenger R, Christina H, Camenisch I. Hypoxia-regulated gene expression in fetal wound regeneration and adult wound repair. *Pediatr Surg Int* 2000; 16:232-236
- 10) Liu LX, Lu H, Luo Y, Date T, Belanger AJ, Vincent KA et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291:908-914.
- 11) Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 27:587-593.
- 12) Ankoma-Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000; 31:141-148.
- 13) Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92:5510-5514.
- 14) Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev* 1998; 12:149-162.
- 15) Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M et al. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; 394:485-490.

- 16) Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1998; 272:22642-22647.
- 17) Liu C, Shi Y, Han Z, Pan Y, Liu N, Han S, Chen Y. Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 transactivation and increases expression of EPO. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312:780-786.
- 18) Yasuda S, Arai S, Mari A. Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor-1 alpha and its significance. *J Hepatol* 2004; 40: 117-123.
- 19) Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276:9519-9525.
- 20) Kim YB, Han JY, Kim PS, Chu YC. Overexpression of c-H-ras p21 is correlated with vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in advanced gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000 ; 15:1393-1399.
- 21) Minchenko O, Opentanova I, Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 2003; 554:264-270
- 22) Roth U, Curth K, Unterman TG, Kietzmann T. The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2004; 279:2623-2631.

- 23) Kalas W, Gilpin S, Yu JL, May L, Krchnakova H, Bornstein P. Restoration of thrombospondin 1 expression in tumor cells harbouring mutant ras oncogene by treatment with low dose doxycycline. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(1):109-116 .
- 24) Liu P, Flejou JF, Feldmann G, Bernuan D. Activation of ras oncogene in livers with cirrhosis. *J Hepatol* 1994; 21:1103-1108.
- 25) Reif S, Weis B, Aeed H, Gana-Weis M, Zaidel L. The ras antagonist, farnesylthiosalicylic acid (FTS), inhibits experimentally-induced liver cirrhosis in rats. *J Hepatol* 1999; 31:1053-1061.
- 26) Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2003; 3:219-231.
- 27) Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth *J Cell Mol Med* 2002; 6:1-12.
- 28) De Jong JS, van Diest PJ , Baak JP. Heterogeneity and reproducibility of microvessel counts in breast cancer. *Lab Invest* 1995; 73:922-926.
- 29) Schiff ER. Hepatic fibrosis- new therapeutic approaches. *N Eng J Med* 1991; 324:987-989.
- 30) Craig JR, Klatt EC, Yu M. Role of cirrhosis and the development of HCC: evidence from histologic studies and large population studies. In: Tabor E, Di Bisceglie AM., Purcell RH (eds) *Adv Applied Biotechnology Series Etiology, Pathology and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in North America*. Gulf Publishing Company, Houston 1991 pp.177-90.

- 31) Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory consideration Virchows Arch (Pathol Anat) 1983; 402:107-137.
- 32) Varin F, Huet PM. Hepatic microcirculation in the perfused cirrhotic rat liver. J Clin Invest 1985; 76:1904-1912.
- 33) Gaudio E, Pannarale L, Onori P, Riggio O. A scanning electron microscopic study of liver microcirculation diarrangement in experimental rat cirrhosis. Hepatology 1993; 17:477-485.
- 34) Wanless IR, Wong F, Blendis LM, Greig P, Heathcote EJ, Levy G. Hepatic and portal vein thrombosis in cirrhosis: possible role in the development of parenchymal extinction and portal hypertension Hepatology 1995; 21:1238-1247.
- 35) Reichen J, Egger B, Ohara N, Zeltner TB, Zysset T, Zimmermann A. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. Multivariate analysis. J Clin Invest 1988; 82:2069-2076.
- 36) Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. J Hepatol 2000; 33:555-563.
- 37) Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiegand S, Holash J. Vascular –specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407:242-248.

- 38) Forsythe J, Jiang B-H, Iyer N, Agani F, Leung S, Koos R, Semenza G. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16:4604-4613.
- 39) Stein I, Neeman M, Shweiki A, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5363-5368.
- 40) Saperstein LA, Jirtle RL, Farouk M, Thompson HJ, Chung KS, Meyers W. Transforming growth factor- β 1 and mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor expression during intrahepatic bile duct hyperplasia and biliary fibrosis in rat. *Hepatology* 1994; 19:412-417.
- 41) Napoli J, Prentice D, Niinami C, Bishop A, Desmond P, McCaughan GW. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and transforming growth factor- β in a bile duct ligated rat model of cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26:624-633.
- 42) Dolecki GJ, Connolly DT. Effects of a variety of cytokines and inducing agents on vascular permeability factor mRNA level in U937 cells. *Biochem Biophys Commun* 1991; 180:572-578.
- 43) Finkenzeller G, Technau A, Marme D. Hypoxia-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is independent of functional AP-1 transcription factor. *Biochem Biophys Commun* 1995; 208:432-439.
- 44) Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth

muscle cells , whereas hypoxia upregulates VEGF expression only
Circulation 1994; 90:649-652.

- 45) Ankoma-Sey V, Matli M, Chang KB, Lalazar A, Donner DB, Wong L, Warren RS, Friedman SL. Coordinated induction of VEGF receptors in mesenchymal cell types during rat hepatic wound healing. *Oncogene* 1998; 17:115-121
- 46) Gerber H, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272:23659-23667.
- 47) Nonomura A, Ohta G, Hayashi M, Izumi R, Watanebe K, Takayanagi N. Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1987; 82:512-518.
- 48) Woodrow MA, Rayter S, Downward J, Cantrel DA. P21 function is important for T cell antigen receptor and protein kinase C regulation of nuclear factor of activated T cells. *J Immunol* 1993; 150:3853-3861.
- 49) Zhang X-K, Huang D-P, Qui D-K, Chiu J-F. The expression of c-myc and c-N-ras in human cirrhotic livers, hepatocellular carcinomas and liver tissue surrounding the tumors. *Oncogene* 1990; 5:909-914.
- 50) Haritani H, Esumi M, Uchida T, Shikata T. Oncogene expression in the liver tissue of patients with non-neoplastic liver disease. *Cancer* 1991; 67:2594-2598.

- 51) Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270 :1230-1237.
- 52) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-845.
- 53) Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jun; 36:961-968.
- 54) Brown LF, Guidi AJ, Schnitt SJ, Van de Water L, Iruela-Arispe ML, Yeo TK. Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma and metastatic carcinoma of the breast. *Clinical Cancer Research* 1999; 5:1041-1056.
- 55) Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL, Yu WC, Tuszynski GP, Fan ST. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:4150-4157.
- 56) Koepfel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Post S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology* 1997; 26:1085-1091.
- 57) Hayashi T, Abe K, Susuki H, Itoyama Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1997; 28:2039-2044.
- 58) Vasir B, Aiello L, Yoon K, Quickel R, Bonner-Weir S, Weir G. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells. *Diabetes* 1998; 47:1894-1903.

- 59) Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 1997; 272:13390-13392.
- 60) Unemori E, Ferrara N, Bauer E, Amento E. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153:557-562.
- 61) Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familietti P, Pan YC, Olander J, Connolly D, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172:1535-1545.
- 62) Yeo E, Chun Y, Cho Y, Kim J, Lee J, Kim M, Park J. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Nat Can Inst* 2003; 95: 516-525.
- 63) Assy N, Spira G, Paizi M, Shenkar L, Kraizer Y, Cohen T, Neufeld G. Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 1999; 30:911-915.
- 64) Moshida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:176-179.
- 65) Medina J, Sanz-Cameno P, Garcia-Buey L, Martin-Vilchez S, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. Evidence of angiogenesis in primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical descriptive study. *Hepatology* 2005;42:124-131.

Medina J, Arroyo A, Sanchez-Madrid F, Moreno-Otero R.
Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004;
39:1185-1195.