



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA (HCC) PROGNOZA ETKİ EDEN
FAKTÖRLER; FARKLI EVRELEMELER ve ANJİYOGENETİK
FAKTÖRLERİN ETKİSİ**

**Dr. AİDOS SYIKYMBAYEV
UZMANLIK TEZİ**

İSTANBUL 2009



**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI**

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMDA (HCC) PROGNOZA ETKİ EDEN
FAKTÖRLER; FARKLI EVRELEMELER ve ANJİYOGENETİK
FAKTÖRLERİN ETKİSİ**

**Dr. AİDOS SYIKYMBAYEV
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN: Doç. Dr. OSMAN CAVİT ÖZDOĞAN

İSTANBUL 2009

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
SİMGELER ve KISALTMALAR	ii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA	5
2.1.1 Tanım ve Epidemiyoloji.....	5
2.1.2. Etyopatogenez.....	7
2.1.3 Klinik	9
2.1.4. Tanı ve Tarama Yöntemleri	10
2.1.5. Patoloji	12
2.1.6. Evreleme	13
2.1.7 Tedavi	15
2.1.8. Korunma	19
2.2. ANJİYOGENEZ.....	20
2.3. ANJİYOGENETİK FAKTÖRLER.....	21
2.3.1. VEGF	21
2.3.2. bFGF	24
2.3.3. ENDOSTATİN	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ	47
7. KAYNAKLAR.....	48

ÖNSÖZ

Tez projemin planlanmasından gerçekleşmesine kadar her aşamasında bana destek olan, bilimsel çalışmanın gerektirdiği düzen ve titizliği öğreten tez danışmanı hocam Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalında görevli

Doç. Dr. Osman Cavit Özdoğan'a,

Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cem Kalaycı'ya,

Deneysel çalışma ve yoğun laboratuvar temposunda birlikte çalıştığımız

PhD. Fatih Eren'e,

Deneysel çalışmalardaki bilgi ve deneyimleri ile projemin genişletilmesine ve özellikle istatistiksel analizlerine yardımcı olan Doç. Dr. Nural Bekiroğlu'na,

Projemin finansal desteğini sağlayan Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Komisyonu'na,

İç Hastalıkları ihtisasım süresince bana rehberlik eden ve öğretimime katkıda bulunan Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Çetin Özener ve Endokrinoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sema Akalın başta olmak üzere tüm hocalarıma,

İhtisasım süresince birlikte çalıştığım tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma,

Her zaman sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Aidos Sykymbayev

11 mart 2009

SİMGELER ve KISALTMALAR

HCC:	Hepatocellular carcinoma
HBV:	Hepatit B virüsü
HCV:	Hepatit C virüsü
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
PGF:	Placental Growth Factor
bFGF, FGF-2:	basic Fibroblast Growth Factor
FGF-1:	acidic Fibroblast Growth Factor
FGFR:	Fibroblast Growth Factor Receptor
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
ERK:	Extracellular signal Regulated Kinase
MEK:	MAPK-ERK kinase
SEER:	Surveillance, Epidemiology and End Results
AFP:	Alfa Feto Protein
IGF-IIr:	Insulin like Growth Factor-II reseptor
AASLD:	American Association for the Study of Liver Diseases
EASL:	European Association for the Study of the Liver
CT:	Computed Tomography
MRI:	Magnetic Resonance Imaging
USG:	Ultrasonografi
PIVKA II:	Protein-induced by vitamin K absence or antagonist II
AJCC:	The American Joint Committee on Cancer
TNM:	Tumor, lymph Nodes, Metastasis
CLIP:	Cancer of the Liver Italian Program
BCLC:	Barcelona Clinic Liver Cancer
MELD:	Model for End-stage Liver Disease
ECOG:	Eastern Cooperative Oncology Group

PST:	Performance Status Test
PHT:	Portal Hipertansyon
RFA:	Radiofrequency Ablation
PEI:	Percutaneous Ethanol Injection
TACE:	Transarterial Chemoembolization
OLT:	Orthotopic Liver Transplantation
AST:	Aspartat aminotransferaz
LDH:	Laktat Dehidrogenaz
SHARP:	Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol
IL-1 β :	Interleukin-1 beta
FGF-4:	Fibroblast Growth Factor-4
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR:	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
TGF- β :	Transforming Growth Factor-beta
TGF-1:	Transforming Growth Factor-1
IGF-1:	Insulin-like growth factor-1
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor-alpha
NO:	Nitric Oxide
HIF-1:	Hypoxia-Inducible transcription Factor-1
PFS:	Progression-Free Survival
TTP:	Time To Progression
AP-1:	Activator Protein-1
MMPs:	Matrix Metalloproteases
ELISA:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HRP:	Horseradish Peroxidase

ÖZET

Bu çalışmadaki amacımız: a)HCC hastalarında anjiyogenetik ve anti-anjiyogenetik faktörlerin tümör evresi ve prognoz açısından öneminin belirlenmesi, b) HCC’de farklı evreleme sistemlerinin karşılaştırılarak en uygun evreleme sisteminin belirlenmesidir.

Çalışmamızda HCC (Hepatosellüler karsinom) tanılı 71 erkek, 18 kadın toplam 89 hasta alındı. Kontrol grubu olarak karaciğer sirozu tanısı almış 20 hasta ve sağlıklı 20 kişi belirlendi. Bu gruplarda serum VEGF, bFGF ve Endostatin düzeylerine ELISA yöntemi ile bakıldı, gruplar arası değerler karşılaştırıldı ve HCC’de olası tümör marker açısından değerlendirildi. Ayrıca, HCC grubunda BCLC, CLIP ve Okuda klasifikasyon sistemleri ile tümör evrelemesi yapıldı ve bunların sağkalım üzerine etkileri değerlendirildi.

Gruplar arası yapılan istatistiksel değerlendirmede tüm anjiyogenetik faktör düzeylerinin HCC ve sağlıklı kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0.05$), ek olarak VEGF düzeyinin HCC ve Siroz grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi ($P<0.05$). Serum anjiyogenetik faktör düzeylerinin evreleme sistemleri (BCLC, Okuda, CLIP) ile ilişkisi değerlendirildi. VEGF düzeyi ile Okuda evreleri arasında istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildi ($P<0.05$). Okuda Stage I ile Stage III arasında VEGF düzeyi açısından istatistiksel anlamlı ($P<0.05$) gösterildi. HCC evreleme sistemlerinin sağkalım üzerine etkisi değerlendirildi; Okuda klasifikasyon sisteminin olası yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). BCLC sisteminin olası yaşam süresi ile ilişkisi anlamlılığa yakın ($P= 0.064$), CLIP sisteminin ise anlamlı değildi ($P>0.05$). HCC’de uygulanan Child-Pugh klasifikasyon sisteminin ve tedavi yöntemlerinin sağkalım üzerine etkisi anlamlı bulundu ($P<0.05$). HCC tanılı hastaların cinsiyet farklarının sağkalım üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlılığa yakındı ($P= 0.071$).

Sonuç olarak başta VEGF olmak üzere diğer anjiyogenetik faktörlerin HCC hastalarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu gösterildi. VEGF’nin erken ve ileri evrelerde farklılık göstermekle beraber bir birine yakın evrelerde ya da aynı evrede olan hastalarda belirgin bir prognostik ayırd edici özellik göstermediği saptandı. Bu da anjiyogenetik faktörlerin tümör progresyonu ile ilişkili ancak prognoz ile ilişkisiz faktörler olduğunu göstermektedir.

Okuda klasifikasyon sisteminin HCC’de tahmini yaşam süresini belirlemede diğer iki (BCLC, CLIP) evreleme sistemine göre daha iyi olduğunu söyleyebiliriz.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: *HCC, VEGF, bFGF, Endostatin, BCLC, CLIP, Okuda*

ABSTRACT

Our aims in this study were both 1) to determine the prognostic significance of pro- & anti-angiogenetic factors and their relations with tumor stage and 2) to compare different HCC staging systems in terms of prognosis prediction.

A total of 89 patients were included to the study (71 male, 18 female). Twenty patients with documented liver cirrhosis and 20 healthy subjects included to the control group. Serum levels of VEGF, bFGF and Endostatin, which were analyzed by ELISA, were compared between the defined groups. The importance of these factors in terms of showing HCC was also examined. HCC group was classified according to BCLC, CLIP and Okuda systems and the prognostic predictivity of these classifications were investigated.

Levels of all angiogenetic factors were statistically different when HCC and control groups are compared ($p<0.05$). Additionally, VEGF levels were different between HCC and cirrhosis groups ($p<0.05$). Serum levels of VEGF did correlate with Okuda classification system ($p<0.05$). There were a statistically significant difference of serum levels of VEGF between Okuda stage I and stage III disease ($p<0.05$).

In analysis of the prognostic predictivity of different HCC staging systems; there was a statistically significant relation between the Okuda classification system and survival ($p<0.05$). But both BCLC and CLIP systems did not have a prognostic predictive value ($p=0.064$ & $p>0.05$).

The prognostic value of Child-Pugh classification was significant ($p<0.05$). Also sex had a tendency for being a prognostic factor ($p=0.071$).

In conclusion, levels of all angiogenetic factors were found to be elevated in HCC patients when compared to non-HCC controls. While levels of VEGF were different in different stages of HCC, it did not have a prognostic value in patients who have close or same HCC stages. This may suggest that angiogenetic factors are related with tumor progression but do not have any impact on prognosis. Our results also showed that the Okuda classification system does predict the expected survival of HCC patients better than the other two (BCLC & CLIP) classification systems.

KEYWORDS: *HCC, VEGF, bFGF, Endostatin, BCLC, CLIP, Okuda*

1. GİRİŞ ve AMAÇ

HCC Dünyada sık görülen kanser türü olup kanser nedenli ölümlerde 3. sırada yer almaktadır. HCC'nin ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda, HBV ve HCV'e bağlı kronik hepatitli hastalar, siroz hastaları, bununla birlikte aflatoksin B1 alımı, kronik alkolizm ve sigara kullanımının HCC riskini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, porfiriya, α 1-antitripsin eksikliği, Wilson hastalığı gibi genetik bozukluklarda da HCC görülme sıklığı artmıştır.

Anjiyogenez varolan kan damarlarından tomurcuklanarak yeni kan damarı oluşumudur. Anjiyogenez oldukça karmaşık mekanizma ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar. Bu süreç içerisinde kan damarları, büyüyen dokunun gelişim ihtiyaçlarını karşılamak veya yaralanan dokuların onarımını sağlamak için bu dokulara besin, büyüme faktörleri, hormonlar ve oksijen temin eder.

Fizyolojik anjiyogenez kontrollü ve sınırlıdır; yara iyileşmesi, menstrüel siklus, embriyogenez vb. durumlarda görülen anjiyogenez bu gruptadır. Patolojik anjiyogenez ise kontrolsüz ve ilerleyicidir; başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit vb), retinopatiler ve psoriasis gibi hastalıklarda görülen anjiyogenez bu gruptadır.

VEGF 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) lokalize molekül ağırlığı 45 kDA olan proteindir. Normal doku ve birçok tümör neovaskülarizasyonunda önemli rol oynar. Anjiyogenezde en temel ve en önemli faktördür. VEGF'nin seçici olarak endotel hücrelerinde mitojenik etki ile damar gelişimini uyarmasının yanı sıra morfogenez ve kemotaksiste de önemli roller üstlendiği bilinmektedir. VEGF'nin hem protein düzeyi hem de mRNA düzeyi ve patofizyolojideki rolü primer ve sekonder HCC, karaciğer sirozu, akut hepatitler ve diğer benign karaciğer tümörleri (hemanjiom, fokal hiperplazi) gibi çeşitli karaciğer hastalıklarında incelenmiştir. HCC'de yüksek serum VEGF düzeyi; tümör kapsülü yokluğu, intrahepatik metastaz, mikroskopik venöz invazyon ve ilerlemiş hastalık durumu ile ilişkili olup prognostik faktör olarak kullanılması araştırılabilir.

bFGF 4. Kromozomun q26-27 bandı üzerinde lokalize polipeptiddir, endotel hücrelerinde çoğalma ve epiplast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar. Ayrıca, bFGF doğrudan veya dolaylı olarak endojen hücre aktivitesini düzenler. Potent bir endotel hücre stimülatörü olan bFGF; endotelde migrasyon, proliferasyon ve tüp formasyonundan sorumludur. bFGF ile VEGF'nin anjiyogenez üzerinde sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. bFGF heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörü olarak VEGF gibi tirozin

kinaz reseptörleri üzerine etki ederek dimerizasyon, otofosforilasyon ve neticede MAPK gibi intrasellüler kinazların aktivasyonunu sağlar. bFGF'nin hipervasküler tümörlerde tümör marker olarak kullanılabileceği ve serum bFGF düzeyinin tümör evresi ile uyumlu olabileceği bildirilmiştir.

Anjiyogenezin vücutta endojen inhibitörleri vardır ve bazılarının potent oldukları anlaşılmış ve yapıları izole edilmiştir. Bu potent inhibitör ajanlardan Trombospondin, Angiostatin, Endostatin ve İnterferonlar gibi birçoğu tedavide kullanılmaktadır. Endostatin kollajen XVIII' in 20 kDA'luk fragmanı olup, endotel hücreden apoptozu indükleyen, migrasyon ve proliferasyonu önleyen endojen anti-anjiyojenik faktördür. Endostatin'in primer tümörden salgılanarak dolaşıma katılımıyla metastatik tümör yayılımının önlendiği bildirilmiştir. Serum Endostatin düzeyi ölçümü; tümör vaskülaritesi hakkında ipucu verebilir ve HCC'in antianjiyojenik tedavisi için önemli bir etkisi olabilir.

Kanserlerin klinik evrelemesi prognozu tayin etmede ve tedavi seçiminde önemlidir. Kolon ve prostat kanserleri başta olmak üzere birçok solid tümörlerde iyi tanımlanmış ve yaygın kullanımı olan prognostik evreleme sistemleri mevcuttur. HCC hastalarında prognoza etki edebilecek 4 anahtar etken olasıdır: 1) tanı esnasında tümörün evresi; 2) hastanın genel sağlık durumu; 3) karaciğerin sentez fonksiyonu; 4) tedavi etkinliği. HCC için önerilen birçok evreleme sistemi mevcuttur ve son dönemde hangi evreleme sisteminin HCC için en iyi olduğu tartışılmaktadır. HCC'de ortak evreleme sisteminin olmaması HCC araştırmalarında erken tanı amaçlı biyomarker gelişiminde ve yeni tedavi seçenekleri geliştirme aşamasında eksikliklere sebep olabilmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız: a)HCC hastalarında anjiyogenetik (VEGF, bFGF) ve anti-anjiyogenetik faktörlerin (Endostatin) tümör evresi ve prognoz açısından öneminin belirlenmesi ve bu faktörlerin tümör gidişatını belirlemek açısından bağımsız belirteçler olup olamayacağının araştırılması, b) HCC tanısı alan hastalarda en çok kullanılan farklı evreleme sistemlerinin karşılaştırılarak en uygun evreleme sisteminin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA

2.1.1 Tanım ve Epidemiyoloji

Hepatosellüler karsinoma (HCC) karaciğerin hepatosellüler orijinli malign tümörüdür. HCC nedeniyle Dünyada yılda 250,000 ile 1 milyon arasında ölüm bildirilmiştir (1-4). Kanserle bağlı ölümlerde 4. sırada, erkeklerde 3. sırada yer almaktadır. Dünyada sıklığı, etyolojide yer alan coğrafik dağılım, cinsiyet, yaş gibi spesifik faktörlere göre değişken özellikler gösterir. HCC'nin jeografik bölgelere göre dağılımındaki değişiklik o bölgede olası hepatit virüslere maruz kalma durumu ve çevresel faktörlere bağlıdır. Örneğin, HBV taşıyıcılığı yüksek ülkelerde HCC insidansı yüksektir. Yüksek sıklıklı bölgeler olarak (yıllık insidansı >15/100,000) Afrika Sahra altı bölgesi (sub-Saharan Africa), Çin Halk Cumhuriyeti, Hong-Kong, Tayvan bildirilmiştir (1). Afrika bölgelerinde HCC insidansı 24.2/100,000 ve Doğu Asya'da insidans 35.5/100,000 olarak bildirilmiştir (5). Çin Halk Cumhuriyeti insanlarında yıllık HCC insidansı 137,000 vaka olup, Dünya'daki tüm HCC vakalarının >%40 oranını oluşturmaktadır (6). Japonya'da yüksek kronik HCV enfeksiyonu nedeniyle HCC insidansı yüksek olduğu bildirilse de son dönem bu sıklığın azaldığı bildirilmiştir (7). Orta düzeyde HCC insidansı Doğu ve Batı Avrupa'nın pek çok ülkeleri, Tayland, Endonezya, Jamayka, Haiti, Yeni Zelanda (Maoris) ve Alaska (Eskimos) olarak bildirilmiştir (1). Gelişmiş ülkeler; Kuzey ve Güney Amerika, Avrupa'nın büyük kısmı ve Orta Doğu'nun bazı bölgelerinde HCC insidansı düşüktür (yıllık insidans <3/100,000) (8,9). ABD'de HCC insidansı Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (National Cancer Institute) yürüttüğü SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) programı sonucuna göre 1998 ve 2000 yılları arasında 4.1/100,000 ve 1970 yılından bu yana kısmi artış olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak, ABD'de yılda yaklaşık 8500 yeni HCC vakası bildirilmektedir (10). Türkiye'de ise HCC sıklıkla daha ileri yaşlarda ve sirotik karaciğer zemininde gelişmektedir. Uzunlunoğlu ve ark. tarafından yayınlanan toplam 207 hastayı içeren araştırmada Türkiye'de etyolojide en sık HBV enfeksiyonu (%56), ikinci sırada ise HCV enfeksiyonu (%23.2) ve buna bağlı oluşan siroz vakaları, üçüncü sırada ise alkolik karaciğer hastalığı olarak bildirilmiştir (11).

2.1.1.1. Cinsiyet ve yaşa göre dağılımı.

Erkeklerde HCC gelişimi daha sıktır. Bu eşitsizlik durumu insidansı yüksek olan bölgelerde daha belirgindir, erkeklerde kadınlara göre 2.1-5.7 kat fazladır (ortalama 3.7:1). Bu oran HCC

insidansı orta düzeyde olan bölgelerde ortalama 2.4:1, ve HCC insidansı düşük bölgelerde daha azdır. Bunun nedeni tam olarak anlaşılamasa da, viral hepatit taşıyıcılığı durumu, çevresel toksinlere maruziyet ve androjenlerin trofik etkilerine bağlı olabileceği düşünülmektedir (4).

HCC, çoğunlukla kronik karaciğer hastalığı veya siroz zemininde ortaya çıkmaktadır. Genelde uzun dönem karaciğer hastalığı olan erkek hastalarda sıkça görülmektedir. Pek çok geniş çaplı prospektif çalışmalar sonucunda, Asya ve Batı Avrupa’da HCC’nin en çok 50 ve 60 yaşları arasında ortaya çıktığı bildirilmiştir (12-14). Sahra altı Afrika’da, HCC görülme yaş ortalaması daha düşüktür ve ortalama 33 yaş olarak bildirilmiştir (15).

2.1.1.2. Irk ve etnik özellikler.

ABD’de yapılan nüfusa yönelik yapılan çalışmada ırk ve etnik özelliklerin HCC insidansı üzerine etkileri bildirilmiştir (16). Asyalılar arasında HCC insidansı beyaz ıspanyol kökenlilere göre yaklaşık 2 kat (6.8’e karşı 11:100,000/yıl), beyaz ırka (Caucasian) (2.6:100,000/yıl) göre 4 kat yüksek saptanmıştır. Bu özellikler ayrıca, altta yatan karaciğer hastalık nedenleri, genetik ve çevresel faktörlere göre değişmektedir.

2.1.1.3. Risk faktörleri.

HCC gelişiminde önemli risk faktörleri bildirilmiştir; Hepatit B virüs taşıyıcılığı, kronik hepatit C virüs enfeksiyonu, herediter hemokromatozis, ve herhangi bir nedenle siroz durumu (9). Ayrıca, bazı hastalarda herhangi bir risk faktörü olmadan da HCC gelişmektedir (17). Çevresel toksinlerden aflatoksin ve kontamine su ile alınan mavi-yeşil alg toksini Microcystin’in de HCC patogenezinde önemli olduğu bildirilmiştir. Bunların kendi başına tüm Dünya’da HCC gelişimi üzerine tam katkıları olmasa da bazı bireylerde diğer risk faktörleri mevcudiyeti ile HCC açısından önemli katkıları olduğu düşünülmektedir. Örneğin Afrika’da ve Güney Asya’da özellikle Aflatoksin-B maruziyetinin yüksek olması ve Hepatit B taşıyıcılığının sıklığı daha genç yaşlarda tümörün oluşmasına neden olmaktadır. Aflatoksinin kronik alımı sonrası gelişen HCC vakalarında p53 tümör supressör geninde mutasyon gösterilmiştir (18,19). Hayvan hepatokarsinogenez örneklerinde, HBV ve aflatoksin birlikteliği durumunda benzer sonuçlar gösterilmiştir (20). Çin’in kırsal bölgelerinde HCC’nin önemli tetikleyicisi mavi-yeşil alg toksini Microcystin içeren gölcüklerden su tüketen insanların temiz su tüketenlere göre HCC mortalitesinde önemli derecede artış (100’e karşı 20:100,000/yıl ölüm) gösteren çalışmalar mevcuttur (21,22).

HCV'li hastalarda siroz veya ileri evre hepatik fibrozis mevcudiyetinde daha sık HCC geliştiği bilinmektedir. Kronik HBV hastalarında ise siroz veya ileri fibrozis olmadan da HCC ortaya çıkmaktadır. HCV hastalarında tanı esnasında inflamasyon derecesinin HCC prognozuna katkısı araştırılmış, pek çok oksidatif stres ve inflamasyon markerleri (CD68+ cells, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) DNA adducts, ve 4-hydroxynonenal (HNE) protein adducts) HCV'li HCC hastalarının kanser dışı karaciğer dokusunda ölçülmüş; marker seviyesi yüksek çıkan hastalarda daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (23). Konağın immun yanıtı durumu da siroz ve kanser gelişiminde önemli bir faktördür (24).

Herhangi bir nedenli kronik karaciğer hastalığı (kronik hepatitler veya siroz) durumunda HCC gelişme riski yüksektir. Pek çok HCC hastasında (%20-56) daha öncesinde altta yatan siroz tablosu mevcuttur (25,26). Kompanse sirozlu hastalarda HCC yıllık insidansı %3-4 arasında değişmektedir, kronik hepatit durumunda yıllık ortalama risk %1 oranında bildirilmiştir. Kronik hepatit hastalarında serum AFP (alfa-fetoprotein) değerinin yükselmesi HCC gelişme riski AFP değeri normal (<20 ng/ml) olan bireylere göre daha yüksektir (13,14). Türkiye'de özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da birinci sırada HBV enfeksiyonuna bağlı kronik karaciğer hastalığı HCC oluşumunda birinci sırada risk faktörü olarak saptanmıştır (11).

2.1.2. Etyopatogenez

HCC çoğunlukla risk faktörlerinden birini veya bir kaçını taşıyan hastalarda yıllar içinde gelişen bir kanserdir. Hepatositlerin gen yapısında meydana gelişen mutasyonlar, tümör supressör genlerin devre dışı kalmasına veya pro-onkojenik genlerin aktif hale gelmesine yol açmaktadır.

HCC'de siroz zemininde gelişen displastik nodüllerin önemli bir kısmının zaman içinde malign karakter geliştirdiği bilinmektedir. Siroz zemininde değişik faktörlerin bir arada HCC oluşmasına zemin hazırladığı düşünülmektedir.

IGF-IIr (Insulin like Growth Factor-II reseptör), hücre membran reseptörü olup apoptozisin aktivasyonunda ve anti-apoptotik sitokinlerin inaktivasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Siroz zemininde gelişen HCC hücrelerinde IGF-IIr'nün önemli oranda kaybolduğu gösterilmiştir (27). Diğer bir faktör de "DNA mismatch repair" genlerinde oluşan mutasyondur. "DNA mismatch repair" geninde oluşan değişiklikler, bir mikrosatellitte meydana gelen tekrarlanan ünitelerin sayısını artırır ve buna mikrosatellit instabilitesi denir. HCC dokularında ve henüz HCC gelişmemiş displastik nodüllerde mikrosatellit instabilitesi saptanmıştır (28). Bunun dışında bir çok kromozom anomalisi, özellikle telomerlerin kısalması birlikteliği görülebilir. Kronik inflamasyon durumunda hücre hasarı ile beraber

yerine yeni hepatositlerin gelmesi ile hücre çoğalması artarak genetik anomalilerin birikmesine yol açar. Tekrarlanan bölünmelerin her defasında kromozomların sonunda bulunan telomerler son kısmında bulunan 45-60 nukleotidi kaybederler. Bunu telomerase enzimi gerçekleştirir. Hücre bölünmesi devam ettiği sürece, telomerlerin kısalması kritik bir değere gelir ve bu değerden sonra artık hücre bölünmesi gerçekleşmez. HCC hücrelerinde telomerlerin çok kısa olduğu saptanmıştır. Bu da HCC hücrelerinin diğer hücrelerden daha fazla bölündüğü ve telomerlerin kritik kısalığa gelmesine rağmen hücre çoğalmasının artarak devam ettiğini gösteren bir bulgudur.

HBV enfeksiyonu ve taşıyıcılığı durumu HCC oluşumunda en önemli risk faktörüdür. Üç mekanizma kronik HBV enfeksiyonunda HCC oluşumuna katkıda bulunabilir. Bunlar HBV enfeksiyonuna bağlı kronik inflamasyonun tetiklediği oksidatif stres faktörleri ve siroza bağlı faktörler, HBV-DNA'sının hepatosit DNA'sına entegre olarak karsinogenezi indüklemesi ve HBV'nin X geni proteininin aktivitesidir. Hepatit B virüs DNA'sı, hepatosit DNA'sının herhangi bir yerine rastgele olarak entegre olabilir. Bu entegrasyon DNA'nın düzenleyici genlerinde bozukluklara yol açarak kromozomal instabiliteye yol açabilir. HBV genomunun kodladığı X antijeni malign değişime yol açabilir. Bunu bir çok mekanizma ile yapabilir. X antijeninin hücre çoğalmasını artırdığı, tümör supressör genlere bağlanarak inaktive ettiği ve DNA onarım mekanizmalarını bozduğu belirtilmektedir.

HCV ise RNA virüsü olması nedeniyle hepatosit DNA'sına bağlanamaz ancak HCV proteinlerinin hepatik karsinogeneze rolleri olduğu düşünülmektedir. HCV core peptidi apoptoz veya hepatosit proliferasyonunda görevli enzimlere bağlanarak bunların fonksiyonlarına etki edebilir. Yapılan çalışmalarda p53 geninin, tümör nekrozis faktör reseptör 1'in, Fas sisteminin, nükleer faktör-kappa B ve hücre siklusu regülatör proteinlerinin değişikliklere uğradığı belirlenmiştir (29). Ancak HCV enfeksiyonunda henüz siroz yokken hastalarda HCC gelişme olasılığı çok düşüktür.

Etyopatogeneze rol alan diğer etkenlerden demir, bakır birikimi ve karaciğer yağlanması özellikle hepatositlerde oksidatif strese bağlı oluşan genomik anomaliler sonucu HCC oluşumuna yol açtığı öne sürülmektedir.

2.1.3 Klinik

Hastaların çoğunda erken dönemde belirgin bir yakınma yoktur. Kompanse sirozlu hastalarda ani gelişen asit, ensefalopati, sarılık, veya varis kanaması gibi karaciğer yetmezliği belirtilerinin ortaya çıkması HCC açısından önemlidir. Bu belirtiler tümörün hepatik veya portal vene invazyonu, veya arteriovenöz şant durumunun göstergesi olabilir (30). Sağ üst kadranda belli belirsiz bir karın ağrısı, beraberinde halsizlik, kilo kaybı, erken doyma hissi, veya üst batında ele gelen kitle gibi yakınmalar eşlik edebilir. Daha az sıklıkla görülen bulgular:

- Tıkaçıcı sarılık, tümörün safra yollarına invazyonu, intrahepatik kanala basısı, veya daha nadiren hemobili durumunda ortaya çıkmaktadır
- Diarre (31)
- Kemik ağrısı veya dispne, uzak metastaz sonucu ortaya çıkmaktadır
- Batın içi kanama tümör rüptürü belirtisidir, hastalarda ani gelişen karın ağrısı, distansyon belirtisi, veya ani hematokrit değerlerinde düşme ve hipotansyon gelişebilir, ve sıklıkla periton lavajı veya laparotomi ile tanı konur
- Ateş, santral tümör nekrozu sonucu görülebilir
- Paraneoplastik sendromlar; hipoglisemi, eritrositozis, hiperkalsemi, veya ciddi diarre görülebilir

HCC hastalarında görülen yakınmalar **Tablo-1**'de özetlenmiştir.

Tablo 1: HCC hastalarında görülen yakınmalar

Sağ üst kadranda ağrısı
Halsizlik
Kilo kaybı
Ateş
İştahsızlık
Sarılık
Asit
Ensefalopati
Önceki karaciğer hastalığının kötüleşmesi

HCC hastalarında fizik muayene bulguları genellikle altta yatan karaciğer hastalığına bağlı olarak (splenomegali, asit, sarılık, veya dekompanse sirozun diğer bulguları) ortaya çıkmaktadır (32).

Laboratuvar tetkikleri genellikle non-spesifiktir. Sirozlu HCC hastalarının çoğunda trombositopeni, hipoalbuminemi, hiperbilirubinemi, ve hipoprotrombinemi görülebilir. Hafif anemi ve diüretik kullanımı sonucu elektrolit dengesizliği (hiponatremi, hipokalemi, metabolik alkaloz) görülebilir. Serum aminotransferazlar, alkalen fosfataz ve gammaglutamil transpeptidaz değerleri çoğunlukla anormal olmakla beraber non-spesifiklerdir (33).

Hastaların %10-20 arasında tanı esnasında metastatik yayılım saptanmaktadır (34-40). Ekstrahepatik metastaz genellikle tümör boyutu >5cm çapında olan hastalarda ortaya çıkmaktadır. En sık yayılım gösterdiği bölgeler; akciğerler, intraabdominal lenf nodları, kemik, beyin, ve adrenal bezlerdir (34,37).

2.1.4. Tanı ve Tarama Yöntemleri

HCC tanısı spesifik patognomonik belirtilerinin olmaması ve karaciğerin geniş fonksiyonel rezervi olması nedeniyle gecikmektedir, dolayısıyla hastaların çoğu tanı esnasında uygun tedavi açısından geç kalmaktadırlar (41,42). Tanı sonrası sağkalım ortalama 6 ile 20 ay arasında değişmektedir (43). Büyük tümör boyutu, vasküler invazyon, fonksiyonel statüsün kötüleşmesi, ve nodal metastazlar kötü prognozün göstergesidirler (44,45).

AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) rehberine uygun olarak, altta yatan karaciğer hastalığı (örn., siroz, kronik viral hepatit hepatitler) olan bireylerde serum alfa-fetoprotein (AFP) değerinde yükselme varsa HCC açısından ileri tetkikler istenmelidir (44). Bu hastalara ilk tanı basamağı olarak, karaciğere yönelik CT (computed tomography) taraması ve/veya MRI (magnetic resonance imaging) tetkiki yapılmalıdır (46). Lezyon hipervasküler, T2 sinyal intensitesinde artış, venöz invazyonu özellikleri içeriyorsa, veya AFP yüksekliği eşlik ediyorsa, tanı genelde kesin HCC'dir.

Siroz olmayan hastalarda bir karaciğer kitlesi özellikle hipervasküler özelliğe sahip ise hemanjiyom veya fokal nodüler hiperplazi dışında HCC ön planda düşünülmelidir. Eğer tanıya özgün bulgu yoksa, biyopsi almak gereklidir.

AASLD rehberine göre altta yatan kronik karaciğer hastalığı (kronik viral hepatit, veya herhangi bir nedenli siroz) olan hastalarda tarama amaçlı yapılan tetkiklerde veya rastlantısal olarak karaciğerde kitle saptanması durumunda kitlenin boyutuna göre HCC açısından değerlendirilmelidir:

- Takip (surveillance) amaçlı yapılan ultrasonografi tetkikinde, <1 cm çapında nodülün saptanması durumunda, 3 ve 6 ay aralıklarla ultrasonografik takip gerekmektedir. 2 yıllık takip sonucunda kitle boyutunda değişiklik yoksa, hasta tekrar rutin takip programında izlenmelidir.
- Sirotik karaciğerin USG taramasında ortaya çıkan 1-2 cm arası boyutta nodül saptanması durumunda ileri tetkik amaçlı 2 ayrı dinamik tetkik (CT taraması, kontrast USG, veya kontrastlı MRI) istenmelidir. İki görüntüleme tetkikinde lezyon HCC açısından tipik özelliklere (hipervasküler, portal/venöz faz tutulumlu) sahip ise HCC tedavisine başlanmalıdır. Eğer bulgular HCC açısından uyumlu değil veya vasküler profili uymuyorsa, lezyondan biyopsi alınmalıdır.
- Eğer nodül boyutu >2 cm ve dinamik görüntüleme tetkikleri sonucunda HCC ile uyumlu ise, ek olarak AFP değeri >200 ng/mL ise biyopsiye gerek yoktur. Bununla birlikte, görüntüleme tetkiklerinde vasküler profil özgü değilse veya siroz olmayan karaciğer dokusunda nodül saptanırsa biyopsi almak gerekmektedir.
- Küçük lezyonlardan elde edilen biyopsi örnekleri deneyimli patoloji uzmanları tarafından incelenmelidir. HCC açısından negatif sonuçlanan hastalar 3-6 ay aralıklarla nodülün kaybolması, büyümesi, veya HCC'ye dönüşme ihtimali göz önünde bulundurularak USG veya CT ile izlenmelidir. Eğer lezyonda büyüme veya HCC açısından önemli değişiklikler saptanırsa biyopsinin tekrarlanması önerilmektedir.

2.1.4.1. Serum markerleri.

HCC'de sıklıkla marker olarak AFP değerlerine bakılmaktadır. Serum AFP değerinin sirozlu hastalarda yükselmesi HCC gelişimi açısından önemli olabilir. Yüksek riskli hastalarda serum AFP değerinin >500 ng/ml olması (normal laboratuvar değeri 10-20 ng/ml) HCC açısından kesin tanı olarak kabuledilirse de (47), AFP değeri düşük olan hastalarda tarama amaçlı yapılan incelemeler sonucu HCC tanısı konulmaktadır (48,49). Diğer birçok serolojik serum markerleri, örn. des-gamma-carboxy prothrombin HCC tanısında tek başına veya AFP ile birlikte kullanılmaktadırlar. Des- gamma-carboxy prothrombin (PIVKA II) değerleri < 3cm çapındaki tümörlerde daha düşük saptanmakta (50,51) ve anormal protrombin düzeyleri de serum AFP düzeyi ile uyumsuzluk göstermektedir (50,52). HCC'de araştırma aşamasında olan diğer markerler de (örn., Tumor-associated isoenzymes of gammaglutamyl transpeptidase, Urinary transforming growth factor-beta-1, Serum alpha-L-fucosidase activity) mevcuttur.

2.1.4.2. Görüntüleme yöntemleri.

HCC’de tanı amaçlı ultrasonografi, CT (computed tomography), MRI (magnetic resonance imaging), ve anjiyografi gibi görüntüleme tetkikleri kullanılmaktadır. Ultrasonografi genellikle AFP değeri ile birlikte tarama amaçlı kullanılmaktadır. Görüntüleme tetkiklerinde tipik görünüm (kitle), AFP yüksekliği ve uygun klinik bulgular mevcudiyetinde genelde HCC tanısı kesinleşmektedir.

2.1.4.3. Tarama ve takip (surveillance) programı.

AASLD (American Association for the Study of Liver Disease) rehberine uygun tarama ve takip (surveillance) gerektiren hasta grubu **Tablo 2’**de gösterilmiştir.

Tablo 2: Tarama ve takip (surveillance) önerilen hastalar (AASLD 2003)

HBV taşıyıcıları
≥40 yaş Asyalı erkekler
≥50 yaş Asyalı kadınlar
Tüm sirozlu HBV taşıyıcıları
Her yaşta, ailesinde HCC olan kişiler
≥20 yaş Afrikalılar, Afrika kökenli Amerikalılar
Siroz hastaları (HBV dışı)
Hepatit C
Genetik Hemakromatozis
Primer Biliyer Siroz
Alkolik karaciğer sirozu

Bruix, J, and Sherman, M. Hepatology 2005; 42:1208.

HCC gelişimi açısından yüksek riskli hastalar takip (surveillance) programına alınmalıdırlar. Takip amaçlı hastalara 6-12 ayda bir ultrasonografi incelemesi ve AFP bakılmalıdır.

2.1.5. Patoloji

Histolojik özelliklerine göre HCC iyi diferansiye formdan (normal hepatositlere benzer hücre yapısı) multinükleer anaplastik tümör dev hücresi özelliklerine sahip olan kötü diferansiye lezyonlara kadar değişiklikler göstermektedir. Büyük tümörlerde sıklıkla santral nekroz gözlenmektedir (53). Dünya Sağlık Örgütü tarafından trabeküler, asinar, kompakt ve şiröz olarak alt histolojik tiplerine ayırmaktadır. Ayrıca fibrolamellar tip olarak tanımlanan,

HCC'lerin %1'ini oluşturan, daha genç hastalarda ve normal karaciğer zemininde gözüken özel bir histolojik tipi mevcuttur. Büyüme ve yayılım özelliklerine göre HCC infiltratif, genişleyen, multinodular veya mixed tip olarak ayırd edilir.

2.1.6. Evreleme

Kanserin evrelemesi hastalığın prognozu ve uygulanacak tedavinin belirlenmesi açısından çok önemlidir. HCC için farklı gruplar veya ülkeler tarafından geliştirilen bir çok evreleme sistemi mevcuttur ve son dönemde hangi evreleme sisteminin HCC'de prognozu belirlemede en iyi olduğu tartışılmaktadır. HCC hastalarında sağkalım açısından 4 anahtar etken çok önemlidir: 1) altta yatan karaciğer hastalığının ciddiyeti; 2) tümör büyüklüğü; 3) tümörün etrafındaki yapılara yayılımı; 4) metastaz durumu (54-58).

AJCC (The American Joint Committee on Cancer) TNM evreleme sistemi 2002'de yeniden gözden geçirilerek düzenlenmiştir, bu sistemin HCC'de prognozu belirlemede tümörün vasküler invazyonu (59,60) ve karaciğerin fibrozis derecesi (61-64) gibi özellikleri mevcuttur. Ancak, altta yatan karaciğer hastalığı durumu, karaciğerin fonksiyonel açıdan değerlendirmede yetersiz kalmaktadır. 5 yıllık sağkalım hızı: Evre I'de %55, Evre II'de %37, Evre III'te %16 olarak bildirilmiştir (60).

2.1.6.1. Okuda sistemi.

Tümör boyutu çok geniş bir ekseninde değerlendirilmektedir, ve sirozun ciddiyetini gösteren üç değeri (asit durumu, serum albümin ve bilirubin değerleri) kapsamaktadır (**Tablo 3**) (54). Bir çalışmada tedavi olmamış hastalarda Okuda evreleme sistemine göre sağkalım; I.Evrede 8.3 ay, II.Evrede 2.0 ay, III.Evrede 0.7 ay olarak bildirilmiştir (54). Okuda sisteminde vasküler invazyon veya nodal metastaz mevcudiyeti değerlendirilmemektedir, dolayısıyla cerrahi tedavi açısından yetersiz kalmaktadır.

Tablo 3: HCC'de Okuda klasifikasyonu

	Puanlar	
	0	1
Tümör boyutu	karaciğerin < %50	karaciğerin > %50
Asit	yok	var
Albümin (g/dl)	≥ 3	< 3
Bilirubin (mg/dl)	< 3	≥ 3
Okuda evre I, 0 puan; Okuda evre II, 1 veya 2 puan; Okuda evre III, 3 veya 4 puan		

2.1.6.2.CLIP skarlama sistemi.

CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) skarlama sistemi HCC prognozu aısından son dönem geliştirilmiş bir evreleme sistemidir. Tümörle ilişkili özellikler (makroskopik tümör yapısı, serum alfa-fetoprotein düzeyi, ve Portal Ven trombozu mevcudiyeti) ile beraber siroz ciddiyeti beraber değerlendirilerek 0'dan 6'ya kadar derecelendirilmektedir (**Tablo 4**).

Farklı jeografik bölgelerde yapılan çalışmalar sonucu, özellikle cerrahi dışı tedavi (örn. transarteriyel kemoembolizasyon) uygulanan hastalarda sağkalım değerlendirmesinde CLIP skarlama sisteminin TNM, Okuda, veya Child-Pugh sistemlere göre daha üstün olduğu bildirilmiştir (55,65,66-69).

Doğrulama çalışmalarında, ortalama sağkalım hızı CLIP 0,1,2,3,4,5 ve 6 evrelerinde; sırasıyla 31,27,13,8,2 ve 2 ay olarak bildirilmiştir (65).

Tablo 4: HCC'de CLIP skarlama sistemi

	<u>Skor</u>		
	0	1	2
Child-Pugh	A	B	C
Tümör morfolojisi	Tek nodül ve ≤ %50 büyüme	Multinodüler ve ≤ %50 büyüme	Masif veya ≥ %50 büyüme
AFP (ng/ml)	< 400	≥ 400	
Portal Ven Trombozu	Yok	Var	
AFP, α fetoprotein.			
Erken evre (0 puan); intermediate (ara) evre (1-3 puan); ileri evre (4-6 puan).			

2.1.6.3.Barselona klasifikasyonu.

BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) evreleme sistemi 4 evreden oluşmaktadır , primer lezyonun büyüklüğü, performans durumu, konstitüsyonel semptomlarının mevcudiyeti, vasküler invazyon, ekstrahepatik yayılım ve Okuda evrelemesini içermektedir (**Tablo 5**) (70). Son iki karşılaştırılmalı çalışmada, cerrahi tedavi planlanan hastalarda diğer prognostik modellere (AJCC TNM sistemini de içeren) göre BCLC sisteminin daha üstün olduğu bildirilmiştir (71,72).

Erken evre (A) hastaları asemptomatikler ve tümör radikal tedaviler açısından uygundur; Ara (intermediate) evre (B) hastaları asemptomatikler ve HCC multinodülerdir; ileri

(advanced) evre (C) hastaları semptomatiktirler, vasküler invazyon ve/veya ekstrahepatik yayılım mevcuttur. D evresi hastalar hem Okuda III evresiyle, hem ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performans durumu klas 3 ve 4 ile uyumludur. B ve C evresi hastalar cerrahi tedavisi açısından uygun olmasalar da, palyatif tedavi veya yeni ajanlarla tedavi (faz II çalışmaları veya kontrollü randomize çalışmalar) yöntemlerinden fayda görebilirler. Evre D hastaları son derece kötü prognozlu olup, ancak semptomatik tedavilerle izlenmelidirler.

Tablo 5: HCC’de BCLC evrelemesi

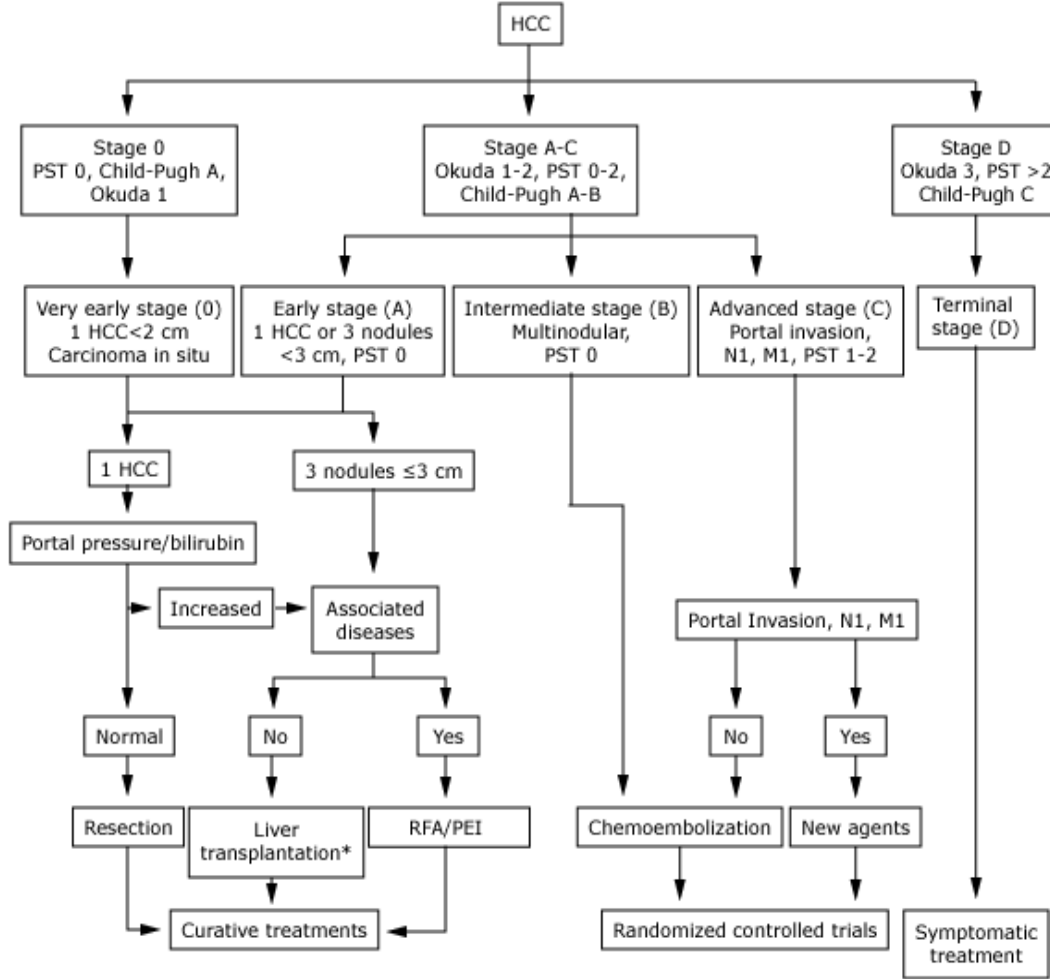
Evre	PST	Tümör Evre	Okuda Evre	Portal HT	Bilirubin	Child-Pugh
A A1	0	Tek	I	Yok	Normal	
A2	0	Tek	I	Var	Normal	
A3	0	Tek	I	Var	Anormal	
A4	0	<3 cm 3 tümör	I-II			A-B
B	0	Büyük multinodüler	I-II			A-B
C	1-2	Vasküler invazyon Ekstrahepatik yayılım	I-II			A-B
D	3-4	Herhangi biri	III			C
Evre A: early (erken) HCC Evre B: intermediate (ara) HCC Evre C: advanced (ileri) HCC Evre D: end stage (son evre) HCC						

2.1.7 Tedavi

HCC’de en etkili tedavi yöntemi cerrahi tedavidir, ancak hastaların çoğunluğu tanı esnasında tümör yayılımı veya altta yatan karaciğer hastalığının ağırlığı nedeniyle cerrahi açısından geç kalmaktadırlar. Cerrahi dışında pek çok tedavi seçenekleri mevcuttur:

- Karaciğer nakli
- RFA (radiofrequency ablation)
- Perkütan ethanol veya asetik asit ablasyonu
- TACE (transarterial chemoembolization)
- Cryoablation
- Radyasyon tedavisi
- Sistemik kemoterapi

HCC’de uygulanacak tedavi seçenekleri hastalığın evresi ile direkt ilişkilidir. İyi bilinen Barcelona çalışma grubunun önerilerine (Şekil 1) uygun olarak HCC hastaları; erken dönem, ara (intermediate) dönem, ileri dönem, ve terminal dönem olarak dört sınıfa ayrılmaktadır (70,73).



Şekil 1: BCLC klasifikasyonu ve tedavi şeması

PST: performance status test; N: nodules; M: metastases; PEI: percutaneous ethanol injection.

*Cadaveric liver transplantation or living donor liver transplantation.

Reproduced with permission from: Llovet, JM, Burroughs, A, Bruix, J. Hepatocellular carcinoma, Lancet 2003; 362:1907. Copyright ©2003 Elsevier.

2.1.7.1.Cerrahi tedavi (kısmi hepatektomi).

Olası küratif kısmi hepatektomi HCC’de en iyi tedavi seçeneğidir. Tek, karaciğer içinde sınırlı kitle, hepatik vasküler yapılar invaze olmayan, portal hipertansyon durumunun olmaması, ve karaciğer fonksiyonlarının iyi korunmuş olması, bunlar cerrahi tedavisi açısından en uygun HCC hasta grubudur (BCLC, evre A). Uzun-dönem nüks-serbest sağkalım

hızı ortalaması %40 veya üstündedir, ve iyi seçilmiş hasta grubunda 5 yıllık sağkalım hızı %90 oranında bildirilmiştir.

2.1.7.2.Karaciğer nakli.

Altta yatan siroz hastalığını da tedavi etmesi nedeniyle altın standart tedavidir. Cerrahi rezeksyon yapılamayan, ancak altta yatan karaciğer hastalığı derecesi tümör yayılımına göre oldukça iyi olan pek çok hasta ortotopik karaciğer nakli açısından (orthotopic liver transplantation-OLT) değerlendirilmelidir. OLT için uygun hasta grubu: cerrahi uygulanamayan hastalar; ≤ 5 cm çapında tek HCC veya herbiri ≤ 3 cm çapında 3 nodül olması, vasküler tutulumun olmaması, ve bölgesel veya uzak metastaz olmamasıdır. İyi seçilmiş HCC hastalarında, uzun-dönem sağkalım hızı malign hastalık olmadan OLT uygulanan hastalarla aynı veya çok az farkla daha kötü olarak bildirilmiştir (74-78). Transplantasyon için gereken bekleme süresi beklenen yaşam süresinde önemli bir belirleyici kriter olabilir. Bu süre içinde bazı hastalar transplantasyon için gereken kriterlerin dışına çıkabilirler. Bu nedenle bekleme dönemindeki hastalara tümörün ilerleme kaydetmemesi için lokal ablatif tedavilerin uygulanması akılcı olabilir.

2.1.7.3.RFA (Radiofrequency ablation).

RFA, HCC’de cerrahi tedavisi kriterlerine uygun olmayan, karaciğer içinde sınırlı lezyon durumunda uygulanan bir tedavi yöntemidir. RFA için tümör boyutu ile ilgili kesin bir sınır belirtilmese de, <4 cm büyüklüğündeki tek tümör durumunda en iyi sonuç alınmaktadır. Siroz hastalarında, bazı klinisyenler RFA açısından ancak Child-Pugh A ve B grubu hastalarının uygun olduğunu belirtmişler (79). RFA tedavisinin olası kısmi hepatektomi yapılabilecek hastalara üstünlüğünün olup olmadığı halen tartışılmaktadır. Az sayıda retrospektif serilerde her iki tedavinin karşılaştırılmalı değerlendirilmesi sonucu RFA’nın uzun-dönem sağkalımı üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir (80,81). Ancak, pek çok klinisyen uygun hastalarda cerrahi rezeksyonu tercih etmektedirler.

2.1.7.4.PEI (Percutaneous ethanol injection).

PEI, küçük HCC’lerde altta yatan karaciğer hastalığı ciddiyeti nedeniyle cerrahi rezeksyon uygulanamayan hastalara sıklıkla tercih edilen yöntemdir. Bu hasta grubunda PEI’in sağkalım üzerine cerrahi tedaviye benzer sonuçlar elde edilmiştir. Etanolun yerine perkütan asetik asit

uygulanan hastalarda benzer sonuçlar, yan etkileri açısından etanole göre daha düşük oranda bildirilmiştir (82,83).

2.1.7.5.TACE (Transarterial chemoembolization).

HCC’de kan dolaşımının büyük kısmını hepatik arter sağlamaktadır, dolayısıyla tümörün kan dolaşımını engellemek ve sitotoksik kemoterapinin direkt tümör içine verilmesini amaçlayan bir yöntemdir. TACE, kemoterapi ajanlarının lipiodol ile beraber veya tek başlarına, veya prokoagulan maddenin hepatik arter içine enjeksiyonu şeklinde uygulanan bir yöntemdir. Lipiodol kemoterapi ajanlarının tümör içinde tutunmalarında yardımcı bir maddedir. Eşzamanlı veya sonrasında meydana gelen hepatik arterin oklüzyonu ile tümör kan akımı engellenmektedir, dolayısıyla kemoterapi ajanlarının etkinliğini de artırmaktadırlar.

TACE, cerrahi veya RFA tedavisinin uygun olmadığı büyük HCC’lerde; nakil öncesi "köprü tedavisi" ("bridging therapy") olarak kullanılsa da, sıklıkla diğer tedavi seçeneği olmayan (off-protocol) hastalara uygulanmaktadır.

Kesin kontrendikasyon durumları: hepatopedal kan akımının olmaması (portal ven trombozu), ensefalopati, ve biliyer obstrüksiyondur. Serum bilirubin >2 mg/dL, LDH >425 U/L, AST >100 U/L, Tümör büyüklüğünün karaciğerin > %50 olması, kalp veya böbrek yetersizliği, asit, son dönem varis kanaması, veya ciddi trombositopeni bilinen relatif kontrendikasyon durumlarıdır.

2.1.7.6.Sitotoksik kemoterapi.

İlerlemiş HCC hastalarına birkaç nedenden dolayı genellikle kemoterapi tercih edilmemektedir:

- HCC genelde kemoterapiye dirençli tümör olarak bilinmektedir. Bunun nedeni yüksek oranda ilaca karşı dirençli gen ekspresyonu, p-glycoprotein, glutathione-S-transferase, heat shock proteinler içermesi, ve p53’te mutasyon olarak bildirilmiştir.
- İlerlemiş HCC hastalarında kemoterapinin sağkalım üzerine yararları değerlendirecek olursa, tümör agresifliği veya sistemik tedavilerin yararlarından daha çok karaciğerin fonksiyonel değerlendirilmesi önemlidir. Altta yatan ciddi karaciğer disfonksiyonu olan hastalar sistemik kemoterapiyi genellikle tolere edememektedir. İleri derece siroz hastalarında kemoterapi etkinliği düşüktür.

Pek çok sitotoksik ajanlar ve/veya kombine ilaç rejimlerinin özellikle karaciğer rezervi korunmuş hastalarda ılımlı derecede antitümör etkinliğini bildiren çalışmalar bildirilse de, bu

veriler kemoterapinin rutin uygulaması için genellikle yetersiz kalmaktadır. Genellikle, sitotoksik tedavi yeterli karaciğer rezervi olan hastalara ve deneyimli merkezlerde verilmesi önerilmektedir. Kronik viral hepatitli HCC hastalarında yoğun sistemik kemoterapi döneminde reaktivasyonlar görülebilir, ve antiviral tedaviler gerekebilir.

2.1.7.7.Moleküler hedef tedavisi: sorafenib.

2007’de yapılan Avrupa’da çok merkezli randomize SHARP çalışmasında, sadece semptomatik tedavi uygulanan ilerlemiş HCC hastalarına sorafenib (multitargeted tyrosine kinase inhibitor) uygulaması sonucu sağkalım üzerine istatistiksel anlamda ılımlı derecede olumlu etkisi bildirilmiştir (84). Bu çalışma sonucu sorafenib monoterapisinin ilerlemiş HCC’de sistemik tedavide önemli olduğu, ayrıca olası kombine ilaç tedavisine yönelik yeni çalışmalar gerektiği bildirilmiştir. Randomize faz II ön çalışmasında, sorafenib ile doxorubicin kombine tedavisinin tekli doxorubicin tedavisi ile karşılaştırılmış; kombine tedavinin sağkalım üzerine daha olumlu olduğu bildirilmiştir (85).

2.1.8. Korunma

HCC’nin özellikle siroz zemininde gelişmesi nedeni ile siroz gelişiminin önlenmesi ve etkin tedavisi birincil önleyici faktördür. Örneğin Tayvan’da Ulusal HBV aşı programının başlatılması ile HCC prevalansı belirgin olarak azalmıştır (86). Sirozlular içinde HCC geliştirme riski yüksek olanlar; ileri yaş, erkek cinsiyet, siroz evresi ileri olan hastalar olmaktadır. Karaciğer biyopsisinde "small cell veya large cell" nodülü olan, yüksek proliferatif index içeren lezyonları olan hastalarda risk daha yüksektir. Bunlarda herhangi bir koruma tedavisinin uygulanması tartışmalıdır. Özellikle interferon ve diğer oral antiviral ajanların HBV ve HCV’li siroz hastalarında HCC oluşumunun engellenmesinde kullanılması önerilebilir (87,88). Polyprenoic asid gibi ajanlar önleyici tedavide halen deneme aşamasındadır.

2.2. ANJİYOGENEZ

Anjiyogenez (neovaskülarizasyon), çok sayıda proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler tarafından sıkı kontrol edilen, mevcut kan damarlarından tomurcuklanarak yeni kan damarı oluşumudur (89,90). Anjiyogenez oldukça karmaşık bir mekanizma ile gerçekleşir. Ekstrasellüler matriks ve matriksi çevreleyen hücrelerden salınan pek çok büyüme faktörü, sitokinler ve reseptörleri anjiyogenezde temel rol oynar (90-92). Anjiyogenez, aşağıda belirtilen olayları kapsayan çok basamaklı bir süreçtir:

1. Bazal membranın proteolitik enzimlerce yıkılması
2. Endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve göçü
3. Tubül oluşumu ve olgunlaşma, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi

Fizyolojik anjiyogenez kontrollü ve sınırlıdır; yara iyileşmesi, menstrüel siklus, embriyogenez vb. durumlarda görülen anjiyogenez bu gruptadır. Patolojik anjiyogenez ise kontrolsüz ve ilerleyicidir; başta tümörler olmak üzere kollajen doku hastalıkları (romatoid artrit vb), retinopatiler ve psoriasis gibi hastalıklarda görülen anjiyogenez bu gruptadır (93). Normalde anjiyogenez aktivatörleri ile inhibitörleri arasında bir denge söz konusudur. Tümör anjiyogenezinde genetik ve çevresel etkenler değişik onkogenlerin aktivasyonuna ve bazı tümör supressör genlerin inaktivasyonuna neden olur. Sonuçta anjiyogenez aktivatörlerinin üretimi artarken anjiyogenez inhibitörlerinin üretimi baskılanır ve tümör hücrelerinde denge anjiyogenez lehine bozularak yeni damar yapımı başlatılır (Angiogenic Switch) (94,95). Gecikmiş yara iyileşmesinde ve periferik arter hastalıklarında ise anjiyogenezin yetersizliği söz konusudur (96).

Anjiyogenezde rol oynayan bir çok endojen düzenleyici molekül tespit edilmiştir (**Tablo 6**). Anjiyogenetik moleküller içinde hayvan modelleri ve klinik çalışmalarda en çok araştırılan moleküller VEGF ve b-FGF'dir (97). VEGF'nin bu dengenin sağlanmasında çok önemli bir yeri vardır. Anjiyogenezde en temel ve en önemli faktördür (98-101). Bu da, VEGF'nin serum ve doku düzeylerinin olası bir prognostik belirleyici olarak değerlendirilebileceğine yol açmıştır.

Tablo 6: Anjiyogenetik faktörler

Pro-anjiyogenik Faktörler	Anti-anjiyogenik Faktörler
Angiogenin	Angiostatin
Angiopoetin-1	Endostatin
Del-1	Vazostatin
Follistatin	Trombospondin-1
Leptin	Heparin
Proliferin	IFN α - β - γ (İnterferon –alpha, -beta, -gama)
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	IL-12 (İnterleukin-12)
IL-8 (İnterleukin-8)	CD 59 kompleman fragmanı
FGF (acidic, basic Fibroblast Growth Factor)	Vaskülostatin
G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)	Retinoidler
HGF (Hepatocyte Growth Factor)	PF-4 (Platelet Factor-4)
TNF α (Tumor Necrosis Factor-alpha)	TIMPs (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases)
PGF (Placental Growth Factor)	hCG (human Chorionic Gonadotropin)
PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)	PAI (Plasminogen Activator Inhibitor)
TGF α , β (Transforming Growth Factor-alpha, -beta)	PRP (Proliferin-Related Protein)

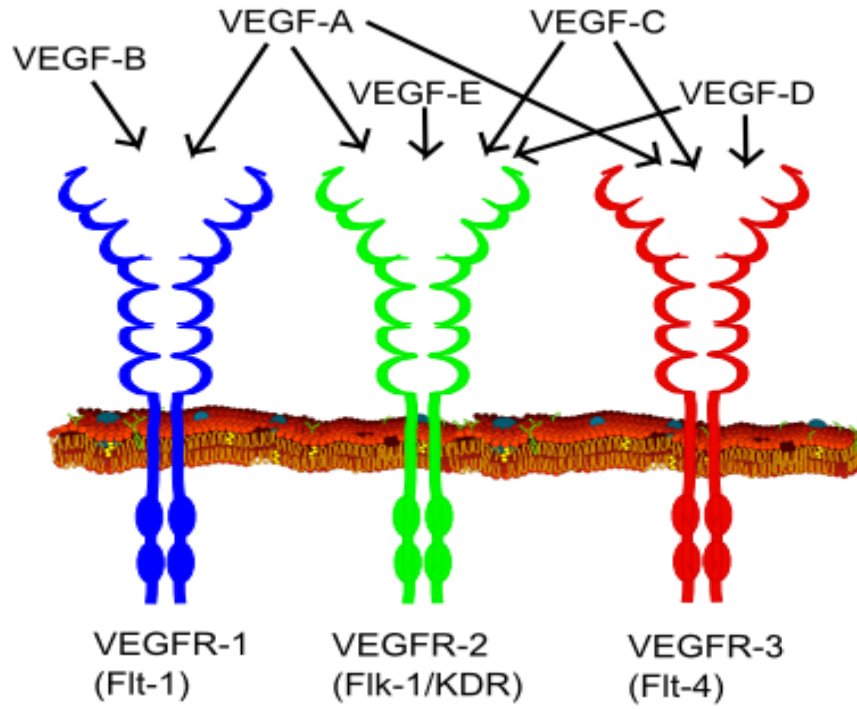
2.3. ANJİYOGENETİK FAKTÖRLER

2.3.1. VEGF

Anjiyogenetik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)'dir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperaillesinin üyesi olan VEGF ailesi (102), endotel hücreleri için özgüdür ve önemli etkileri vardır (103). VEGF, 6. kromozomun kısa kolunda (6p12) lokalize molekül ağırlığı 45 kDA olan bir sitokindir (104,105). VEGF'nin seçici olarak endotel hücreleri üzerinde mitojenik etki ile damar gelişimini uyarmakta ve ayrıca morfogenez ve kemotaksiste de önemli olduğu bilinmektedir (103). Vücutta değişik hücrelerden ve tümör hücrelerinden salgılanan hemodinamik bir glikoproteindir. VEGF homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve PGF (Placental Growth Factor) olmak üzere yedi üyesi mevcuttur (106). VEGF-A, Human-VEGF olarak da bilinmektedir. VEGF-A geni kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Şuana kadar bilinen altı adet izoformu vardır: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. İsimlerindeki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir. En baskın formu VEGF₁₆₅'tir (107). VEGF₁₂₁ dışında, diğer formları heparine bağlanmaktadır (108). Ancak tüm bu izoformların fizyolojik

önemi tam olarak tespit edilmemiştir. Vasküler endotel hücrelerinde VEGF'nin yüksek afinite gösterdiği 3 reseptör gösterilmiştir (102,109).

1. VEGFR-1/Flt-1 (fms-like tyrosinekinase-1)
2. VEGFR-2/Flk-KDR (kinase domain region-fetal liverkinase)
3. VEGFR-3/Flt-4 (fms-like tyrosinekinase-4)



Şekil 2: VEGF reseptörleri

Tirozin kinaz reseptör ailesinden olan VEGF reseptörleri içinde anjiyogenez sürecinde en önemli rolü VEGF-2 (Flk-1/KDR) reseptörü oynamaktadır; VEGF'nin mitojenik ve permeabilite etkisinde en önemli reseptördür. Alınan sinyali hücre içine ileterek hücre proliferasyonu ve kemotaksise neden olmaktadır. VEGF ailesi kan damarlarının yapılanmasını ve damar permeabilitesini VEGFR-1/Flt-1 ve VEGFR-2/Flk-KDR reseptörleri ile etkileşerek kontrol ederler (110).

VEGF; fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde temel düzenleyicidir. Anjiyogenezdeki rolünün yanı sıra vasküler permeabiliteyi artırıcı etkisi vardır ve bu etki histaminin etkisinden 50000 kat daha üstündür (111). Bu etkisi damar duvarından proteinlerin sızmasına, fibrin matriks oluşumuna ve stromal hücrelerin invazyonuna yol açarak tümör hücrelerinin yaşaması için elverişli ortam hazırlar. Ayrıca, bazen tümörlerin etrafında oluşabilen ödem ve kanserlerde oluşan asit ve plevral efüzyon gelişimi de VEGF'nin damar geçirgenliğini artırması etkisine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin migrasyon, proliferasyon ve farklılaşmasını sağlar (111). VEGF yapımı; RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri, p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α , NO gibi birçok endojen ajan tarafından düzenlenmektedir ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır (112). Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksi durumlarında düzeyi hızla artan HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (113). VEGF olası temel anjiyogenik faktör olma özelliği yanında, damarlarda endotel hücreleri arasında fenestrasyon, veziküler organeller ve transsellüler gap oluşumunu destekleyerek vasküler permeabilityi artırır (114). Endotel hücreleri için migratuar özelliği yanında VEGF; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu matriks metalloproteinazlar, ürokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Bunun sonucu olarak ta invazyon ve metastazı kolaylaştırır (115).

VEGF'nin hem protein düzeyi hem de mRNA düzeyi ve patofizyolojideki rolü metastatik ve primer HCC, karaciğer sirozu, akut ve kronik hepatitler ve diğer benign karaciğer tümörleri (hemanjiom, fokal hiperplazi) gibi çeşitli karaciğer hastalıklarında yaygın olarak incelenmiştir (102,116-119). HCC'de yüksek serum VEGF düzeyinin; tümör kapsülü yokluğu, intrahepatik metastaz, mikroskopik venöz invazyon, ilerlemiş hastalık durumu ile ilişkili olabileceği ve HCC için olası prognostik faktör olabileceği bildirilmiştir (120). Ayrıca, cerrahi rezeksyon sonrası metastatik rekürens değerlendirilmesinde olası biomarker olabileceğini bildiren yayınlar da mevcuttur (121).

HCC tedavisinde VEGF veya reseptör (VEGFR) inhibitörleri geliştirilmektedir ve faz I ve/veya II çalışmaları mevcuttur.

Bevacizumab (Avastin), VEGF hedefli humanized monoklonal antikordur (122), tek başına veya diğer ajanlarla kombine kullanımı ile ilgili faz II çalışmaları bildirilmiştir; yanıt oranı orta derecede %10-20 ve yüksek hastalık kontrol oranı (high disease control rate) %47-90 arasındadır. Ortalama progresyonsuz sağkalımı (PFS = progression-free survival) üzerine etkisi özellikle erlotinib ile kombine tedavisinde 5.3-9.0 ay olarak bildirilmiştir (123-127). VEGFR içeren değişik küçük moleküler multi-kinase inhibitörleri HCC tedavisi açısından değerlendirilmiştir; Sorafenib, oral multi-kinase inhibitörü olup, Raf/MAPK-ERK kinase (MEK)/extracellular signal regulated kinase (ERK) uyarısını Raf kinase aşamasında bloke ederek tümör hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir ve VEGFR-2/-3 hedef alarak antianjiyogenik etkilidir. Faz II çalışmalarında sorafenib: yanıt oranı %2, ortalama ilerleme zamanı (TTP= time to progression) 4.2 ay olarak bildirilmiştir (128). TSU-68, oral

antianjiyogenik bileşiktir; VEGFR-2, PDGFR ve FGFR bloke etmektedir. Faz I/II çalışmalarında: iyi tolere edildiği ve yanıt oranı %7 olarak bildirilmiştir (129). Sunitinib, oral tyrosine-kinase reseptör inhibitörüdür ve VEGFR, PDGFR ve c-kit'e karşı etkilidir; ileri HCC hastalarında faz II çalışmaları bildirilmiştir (130,131).

2.3.2. bFGF

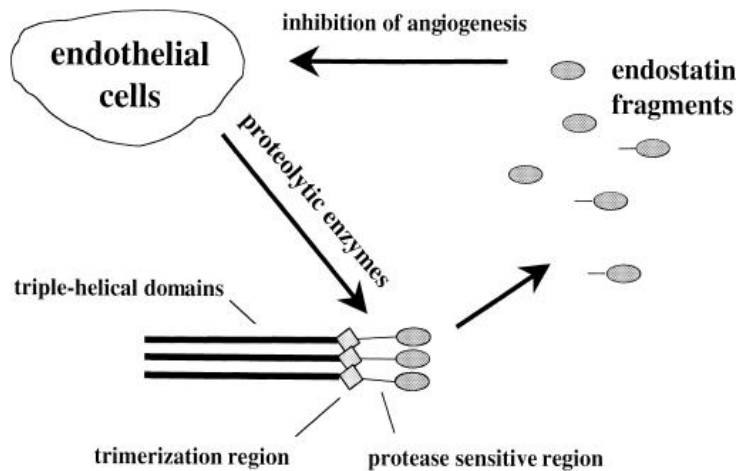
Fibroblast Büyüme Faktörleri (Fibroblast Growth Factors, FGFs), polipeptid yapısında olan büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadır. FGFs ailesinin başta FGF-1 (acidic FGF) ve FGF-2 (basic FGF, bFGF) olmak üzere en az 22 bilinen üyesi mevcuttur (132). Bunların çoğu 16-18 kDa molekül ağırlığında tek zincir peptid yapısında olup, heparin ve heparan sulfata karşı yüksek affiniteye sahiptirler. Heparin proteoglikanları varlığında hücre yüzeyinde bulunan FGF reseptörlerine bağlanarak hücreler üzerine etkilerini gösterirler. Anjiyogeneze, yara iyileşmesinde ve embrio gelişiminde önemli rol oynadıkları bilinmektedir.

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor / FGF-2,) 4. kromozomun q26-27 bandı üzerinde lokalize polipeptiddir. bFGF, endotel hücrelerinde çoğalma ve epiplast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar (133). Ayrıca, bFGF doğrudan veya dolaylı olarak endojen hücre aktivitesini düzenler. Potent bir endotel hücre stimülatörü olan bFGF; endotelde migrasyon, proliferasyon ve tüp formasyonundan sorumludur (134). bFGF ile VEGF'nin anjiyogeneze sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir (135). Fakat farklı olarak bFGF'nin olmadığı ortamda yapılan fare deney çalışmalarında damar oluşumunun gözlenmesi bFGF'nin özellikle erişkin vasküler yapının korunması ve yara iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir (136). bFGF, heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörü olarak VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerine etki ederek: dimerizasyon, otofosforilasyon ve neticede mitogen activated protein kinaz (MAPK) gibi intrasellüler kinazların aktivasyonunu sağlar. Böylelikle AP-1 (activator protein-1) gibi transkripsiyon faktörleri uyarılarak mitojenik etkili genlerde cevap oluşturulur (137). bFGF'in hipervasküler tümörlerde tümör marker olarak kullanılabilir. Serum bFGF düzeyinin tümör evresi ile uyumlu olabileceği bildirilmiştir (138). Diğer bir çalışmada, serum bFGF düzeyinin HCC hastalarında diğer benign karaciğer hastalığı olanlar ve sağlıklı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu saptamışlar, dolayısıyla bFGF'nin HCC için olası tümör marker olabileceği ve HCC tedavisinde yeni hedef sahası olabileceği bildirilmiştir (139).

2.3.3. ENDOSTATİN

Anjiyogenezin vücutta endojen inhibitörleri mevcuttur ve bazılarının potent oldukları anlaşılarak yapıları izole edilmiştir. Bu potent inhibitör ajanlardan Trombospondin, Angiostatin, Endostatin ve İnterferonlar gibi birçoğu tedavide kullanılmaktadırlar. Endostatin, endotel hücrelerinde apoptozu indükleyen, migrasyon ve proliferasyonu önleyen endojen anti-anjiyogenik faktördür. Endostatin kollajen XVIII'in 20kDa'luk fragmanıdır. Anjiyogenez başlangıcında FGF-2, VEGF gibi değişik sitokinler, sonraki evrelerinde PDGF (Platelet Derived Growth Factor) ve TGF-1 (Transforming Growth Factor-1) rol almaktadır (140). Anjiyogenezin tetikleyicileri genelde hücre yüzeyinde bulunan heparan sulfat proteoglikanlara bağlanmaktadır. FGF-2, VEGF'nin anjiyogenezi tetiklemek için co-factor olarak proteoglikanlara ihtiyaç duydukları bilinmektedir. Collagen XVIII, vasküler ve membranların epitelyal yapıtaşında yer alan heparan sulfat proteoglikanların asıl (core) proteinidir, endotel hücrelerine bağlı anjiyogenezde perlecan ile beraber pozitif co-factor olarak görev yapması olasıdır (141). Anjiyogenez başlangıcında, endotel hücreleri MMPs (matrix metalloproteases) ve cathepsin L gibi proteolitik enzimleri salgıtmaktadır, bunlar da collagen XVIII'in proteaz-sensitif esas bölgesi olan NC1 alanına peptit bağları ile bağlanmaktadır ve sonuçta anjiyogenezin lokal inhibitörü olan endostatin fragmanlarını ortaya çıkarmaktadır. Collagen XVIII/Endostatin sistemi anjiyogeneze bağlı proteolitik aktiviteleri algılayarak ("sensor"), antianjiyogenik fragmanları salarak anjiyogenezi negatif yönde etkileyebilir. Dolayısıyla, collagen XVIII/Endostatin sistemi endotelial aktivasyon esnasında antianjiyogenik fragmanların ortaya çıkmasında etkili proteolitik enzimleri üreterek anjiyogenezde lokal inhibitör olarak görev yapmaktadır (Şekil 3).

U.K. Zetterstrom *et al.*



Şekil 3: Collagen XVIII/Endostatinin anjiyogenezdeki lokal regülâtör rolü (Modified from Felbor *et al.*, 2000).

HCC’de Endostatin ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır; yüksek miktarda tip XVIII kollajen salgılayan HCC’lerin önemli derecede düşük oranda küçük damar yoğunluğu içerdiğini saptanmıştır (142). Bir başka çalışmada Endostatin’in primer tümörden salgılanarak dolaşıma katılımla metastatik tümör yayılımının önlendiği bildirilmiştir (143). Serum endostatin düzeyi ölçümü; tümör vaskülaritesi hakkında ipucu verebilir ve HCC’in antianjiyojenik tedavisi için önemlidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta grubu

Çalışmaya 25.01.2008-23.01.2009 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniği ve İç Hastalıkları servisinde ilk tanısı yapılan ileri tetkiklerle konulan veya polikliniklerden daha önce tanısı konulmuş HCC (Hepatosellüler karsinom) tanısı ile takipli 71'i erkek, 18'i kadın toplam 89 hasta alındı. HCC tanısı AASLD, EASL rehberlerine uygun olarak konuldu. Kontrol grubu olarak Gastroenteroloji polikliniğinden takipli daha önce karaciğer sirozu tanısı almış 20 hasta ve herhangi bir karaciğer hastalığı bulunmayan tamamı sağlıklı kişilerden oluşan 20 kişi belirlendi.

3.2. Dahil olma kriterleri

Yaş, cinsiyet, etyoloji farkı gözetmeksizin Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Gastroenteroloji polikliniği ve İç Hastalıkları servisinde tanı almış HCC hastaları çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair yazılı onay verdikten sonra çalışmaya dahil edildi. Tüm hastalara ayrıntılı anamnez (yaş, cinsiyet, demografik bilgileri), fizik muayene bulguları, altta yatan kronik karaciğer hastalığı öyküsü, aldığı tedavileri, laboratuvar tetkikleri, görüntüleme tetkikleri (USG, CT, MRI) sonuçlarını da içeren ayrıntılı sorgulama formu dolduruldu. Hastalara belli aralıklarla Gastroenteroloji poliklinik kontrolü takibi önerilerek, takibe gelmeyen hastalara da telefonla ulaşılarak sonraki hastalık progresyonu durumları hakkında bilgiler edinildi.

3.3. Çıkarılma kriterleri

Çalışmaya katılmış olan hastaların herhangi bir sebepten kendi istekleri ile tez çalışmasından çıkmak istemeleri veya değerlendirme amacıyla yapılan tetkiklerden sonuç alınmaması durumları olarak belirlendi.

3.4. Çalışma düzeni

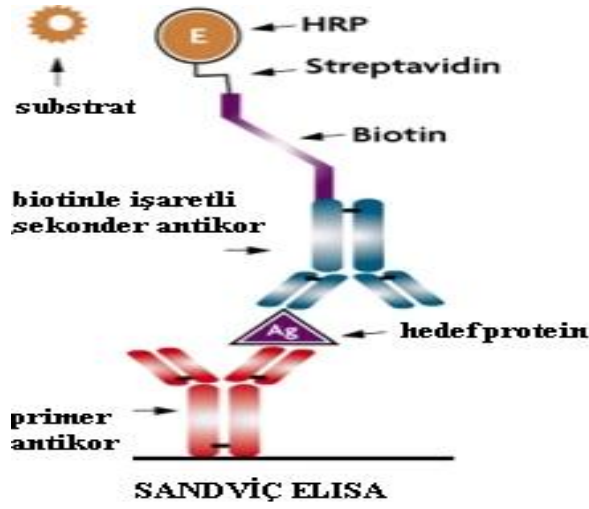
Çalışma, poliklinik takibi ve serviste yatış sırasında hastalara rutin olarak yapılan işlemlere yönelik bilgilerin toplanması temeline dayandırıldı. Çalışmada uyguladığımız tetkikler ve incelemeler aşağıda bildirilmiştir.

3.5. VEGF, bFGF, Endostatin serum konsantrasyonu ölçümü

Human VEGF (KHG0111), *Human FGF-b* (KHG0021) ELISA kitleri *Biosource CA*, *Human ENDOSTATIN* (CYT158) ELISA kiti *Chemicon International* firmalarından temin edildi.

Hastalardan yazılı onay alındıktan sonra 10 cc sarı kapaklı jelli tüplere serum numunesi için venöz kan alındı. Bu kanların serumu ayrıştırılıp uygun ısı derecesinde saklandı.

Hastalardan alınan serum örnekleri, çalışmaya alınmadan önce; kullanılacak miktarlara göre alıgotlanmış olup, her ELISA testi için bir kez kullanılmıştır. Kullanılan tüm kitler “sandviç ELISA” prensibine (Şekil 4) dayalıdır. Sırasıyla standartlar, çalışma kontrolleri ve hasta serumları, hedef proteine spesifik antikorlarla kaplı kuyulara eklendi. Hemen sonrasında biotinle işaretlenmiş hedef proteine spesifik sekonder antikorlar ilave edildi. Böylece serumda düzeyi belirlenecek proteinlerin, kuyulardaki immobilize edilmiş primer antikorlar tarafından yakalanması ve biotinle işaretli sekonder antikorların hedef proteine bağlanarak immobilize edilmesi sağlandı. Biotin haberci bir molekül olup streptavidine yüksek bağlanma afinitesi gösterir. İnkübasyon sonrası bağlanmamış materyalin ortamdan uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapıldı. Enzim aşamasında streptavidin ile konjuge edilmiş *Horseradish Peroxidase* (HRP) enzim solüsyonu, kuyulara eklendi. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrarlandı. Bir sonraki adım olarak substrat solüsyonu kuyulara konularak ışıkla teması olmayacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde yıkama sonrası sekonder antikorun biotini ile kompleks yaparak ortamda kalan konjuge enzimin dolayısıyla da hedef proteinin miktarı kadar substrat parçalanarak renk oluşumu sağlandı. Son aşama olarak renk gelişimini durdurmak amacıyla durdurma solüsyonu eklenerek hemen ELISA okuyucusunun uygun dalga boylarında plaklar okutuldu. Standart absorbans değerleriyle bir standart eğri oluşturularak denek örneklerindeki hedef proteinlerin miktarı tayin edildi. Kontrol değerlerinin konfirmasyonu sağlandı. Sonuç değerlerin hesaplanması için bilgisayar programı kullanıldı. Test süresince uygulanan tüm aşamalar kitlerin talimatnamesine göre yapıldı.



Şekil 4: Sandviç ELISA prensibi

3.6. BCLC, CLIP, Okuda klasifikasyon sistemleri

Hastaların anamnez bilgileri, performans statusu, fizik muayene bulguları, laboratuvar tetkikleri, görüntüleme tetkik sonuçlarına göre BCLC, CLIP, Okuda klasifikasyon sistemlerine uygun olarak HCC evrelemesi yapıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SEM) olarak belirtildi. Sayısal değişkenler *tek yön ANOVA* ve *Tukey testi* ile, kategorik değişkenler *ki kare testi* ile karşılaştırıldı. Sağkalım analizi için *Kaplan-Meier testi* kullanıldı. *P* değerinin 0,05 den küçük olması ($P < 0.05$) halinde veriler istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi. Tüm istatistiksel analizler SPSS 16.0 programı ile yapıldı.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu tarafından B.30.2.MAR.0.01.00.02/AEK-58 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya hasta grubunda 71 erkek (%79.8), 18 kadın (%20.2) olmak üzere toplam 89 kişi alındı, kontrol grubunda (a) karaciğer siroz tanısı almış 14 erkek (%70), 6 kadın (%30) toplam 20 hasta ve (b) altta yatan herhangi bir karaciğer hastalığı olmayan 13 erkek (%65), 7 kadın (%35) toplam 20 kişi vardı.

Çalışmanın sonraki aşamalarında 11 hastanın (5 erkek, 6 kadın) demografik ve klinik bilgilerinin eksik olması, poliklinik takibe düzenli gelmemeleri ve kendilerine ulaşamadığından bu hastaların sağkalım analizleri değerlendirilemedi.

Hasta grubun yaş ortalaması 63.90 ± 10.76 , kontrol grubun yaş ortalaması; (a) siroz grubu 60.37 ± 10.63 , sağlıklı grubun yaş ortalaması; 61.17 ± 11.11 idi. Gruplar arasındaki yaş, cinsiyet dağılımı bakımından anlamlı fark saptanmadı.

Grupların demografik bilgileri, altta yatan karaciğer hastalığı (siroz etiyolojisi, evresi), ortalama izlem süresi, ortalama yaşam süresi **Tablo 7**'de bildirilmiştir.

Tablo 7: Grupların demografik, klinik özellikleri

	HCC	Siroz	Kontrol
Yaş (yıl/(SD))	63.90±10.76	60.37±10.63	61.17±11.11
Cinsiyet (E/K)	71/18	14/6	13/7
Siroz Etiyolojisi:	N(%)	N(%)	
Kriptojenik	11 (14.10)	7 (35)	
HBV	36 (46.15)	5 (25)	
HCV	20 (25.64)	5 (25)	
HBV+HCV	1 (1.28)	-	
HBV+Delta	1 (1.28)	-	
Alkol	2 (2.56)	2 (10)	
Otoimmün hepatit	1 (1.28)	-	
HBV+Alkol	3 (3.84)	1 (5)	
HCV+Alkol	3 (3.84)	-	
Child-Pugh	N(%)	N(%)	
A	36 (46.15)	10 (50)	
B	30 (38.46)	6 (30)	
C	12 (15.38)	4 (20)	
AFP	N(%)	N(%)	
<20 ng/ml	30 (38.46)	20 (100)	
>20 ng/ml	48 (61.53)	0 (0)	
HCC Evre:	N(%)		
BCLC A	22 (28.21)		
BCLC B	39 (50.0)		
BCLC C+D	17 (21.79)		
Okuda I	30 (38.46)		
Okuda II	28 (35.90)		
Okuda III	20 (25.64)		
CLIP Erken	12 (15.38)		
CLIP Orta	48 (61.54)		
CLIP İleri	18 (23.08)		
İzlem süresi*	8.73±1.21		
Yaşam süresi*	15.97±2.84		

* mean±SE/ay

HCC, Siroz ve Kontrol gruplarında bakılan serum VEGF, bFGF ve Endostatin düzeyleri **Tablo 8**'de verilmiştir. Her üç grup arasında bakılan tüm anjiyogenetik faktör düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ($P<0.05$). Gruplar arası değerler istatistiksel olarak homojen dağılmadığından dolayı, değerler önce logaritmik olarak homojenize edildikten sonra geometrik mean olarak değerlendirildi.

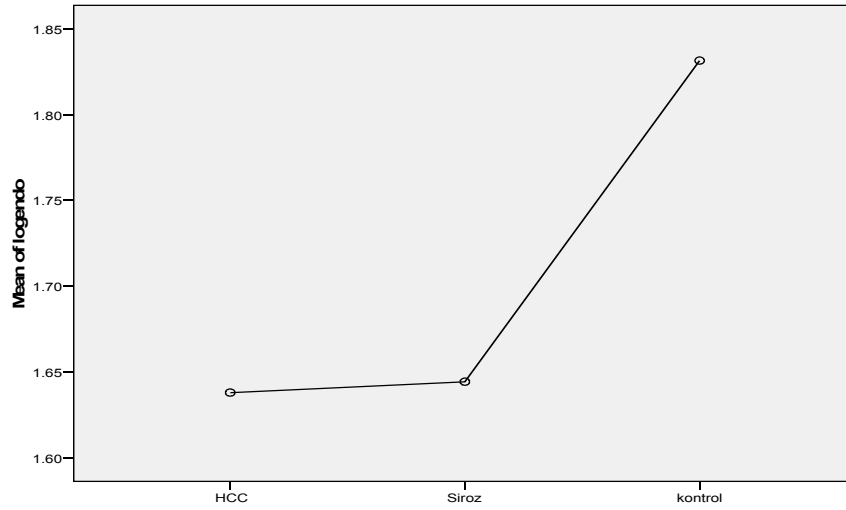
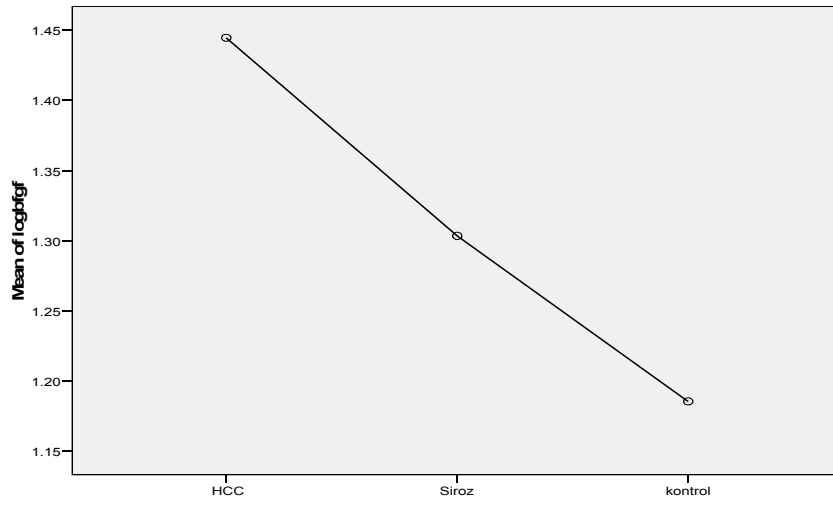
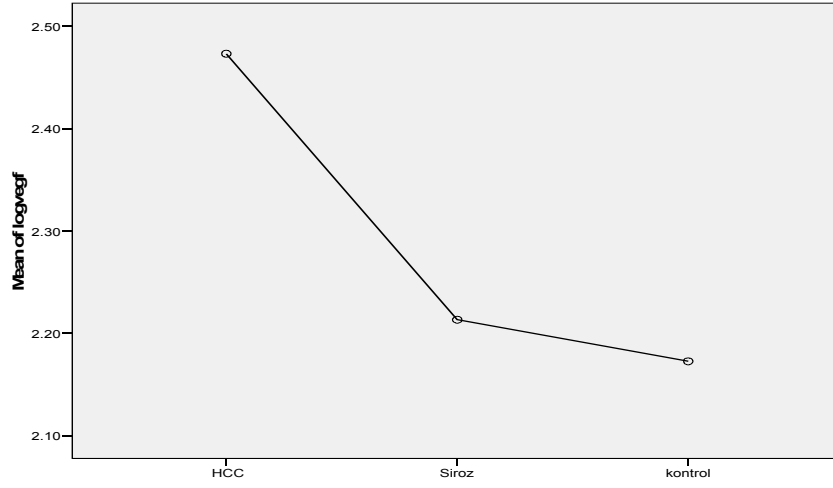
Tablo 8: Homojenize edilmiş grupların anjiyogenetik faktör düzeyi (geometrik mean)

	HCC	Siroz	Kontrol	P value
logVEGF (pg/ml)	297.03	163.34	148.76	0.001
logbFGF (pg/ml)	27.82	20.11	15.33	0.001
logEndostatin (ng/ml)	43.45	44.09	67.84	0.016

Üç grup arasında bakılan değerlerde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildiğinden, gruplar arası *Post Hoc test (Tukey testi)* analizi yapıldı (**Tablo 9, Şekil 5a,5b,5c**); tüm anjiyogenetik faktör düzeylerinin HCC ve Kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($P<0.05$), ek olarak VEGF düzeyinin HCC grubunda siroz grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterildi ($P<0.05$). Faktörler arası sinerjistik etkileri değerlendirilmesinde ise sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$).

Tablo 9: Grupların logaritmik değerlendirilmesi ve *Post Hoc test (Tukey testi)* sonuçları

	gruplar	P value
logVEGF	HCC vs Siroz	0.026
	HCC vs Kontrol	0.008
	Siroz vs Kontrol	0.944
logbFGF	HCC vs Siroz	0.137
	HCC vs Kontrol	0.002
	Siroz vs Kontrol	0.422
logEndostatin	HCC vs Siroz	0.995
	HCC vs Kontrol	0.012
	Siroz vs Kontrol	0.082



Şekil 5a: Grupların serum VEGF (log) düzeyi ortalaması

Şekil 5b: Grupların serum bFGF (log) düzeyi ortalaması

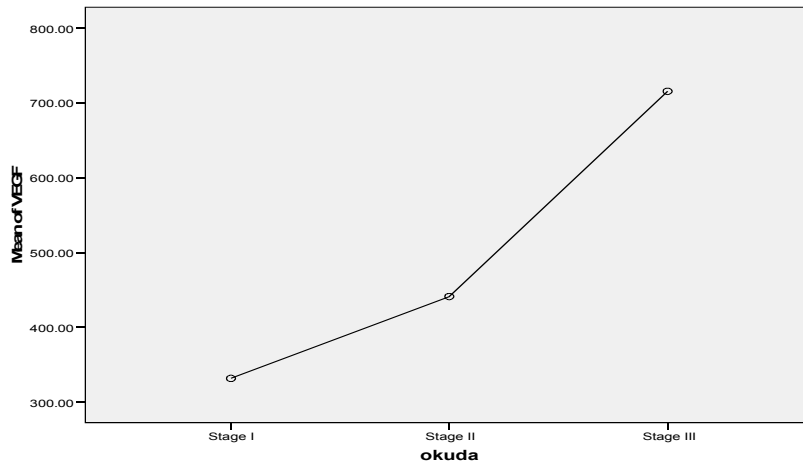
Şekil 5c: Grupların serum Endostatin (log) düzeyi ortalaması

Tüm anjiyogenetik faktör düzeylerinin HCC grubu ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmektedir.

Serum anjiyogenetik faktör düzeylerinin HCC’de evreleme amaçlı kullanılan klasifikasyon sistemleri (BCLC, Okuda, CLIP) ile ilişkisi değerlendirildi. Serum VEGF düzeyi ile Okuda klasifikasyon sistemi evreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ($P<0.05$). HCC’nin alt gruplarının serum VEGF düzeyleri istatistiksel olarak homojen dağıldığı için alt gruplar arasındaki karşılaştırma parametrik *ANOVA testi* ile yapılmıştır (Tablo 10, Şekil 6).

Tablo 10: Okuda klasifikasyon sistemi ile serum VEGF düzeyi arasındaki ilişki (*ANOVA testi*)

	Stage I	Stage II	Stage III	P value
VEGF (pg/ml±SD)	323.28±368.43	441.05±258.14	715.52±669.41	<0.01



Şekil 6: Serum VEGF düzeyi ortalamasının Okuda klasifikasyonu sistemi ile ilişkisi

Serum VEGF düzeyi ile Okuda klasifikasyon sistemi evreleri arasında istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildiğinden, gruplar arası *Post Hoc test (Tukey testi)* analizi yapıldı; Okuda Stage I ile Stage III arasında serum VEGF düzeyi açısından istatistiksel anlamlı ($P<0.05$) ve Stage II ile Stage III arasında ise istatistiksel olarak anlamlılığa yakın ($P= 0.088$) sonuçlar gösterildi (Tablo 11).

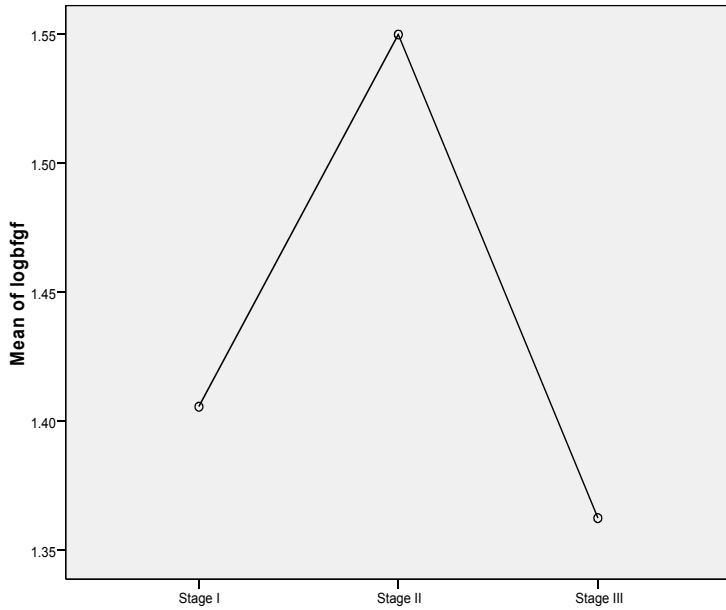
Tablo 11: Okuda klasifikasyon sistemi ile serum VEGF düzeyi arasındaki ilişkinin *Post Hoc test (Tukey testi)* sonuçları

	Okuda	P value
VEGF	Stage I vs Stage II	0.608
	Stage I vs Stage III	0.009
	Stage II vs Stage III	0.088

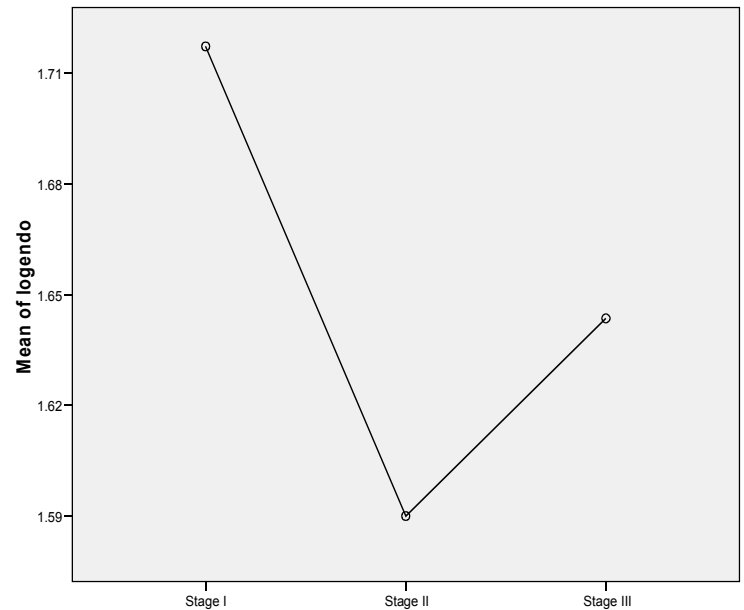
HCC'nin alt gruplarının serum bFGF ve Endostatin düzeyleri istatistiksel olarak homojen dağılmadığından dolayı, değerler önce logaritmik olarak homojenize edildikten sonra geometrik mean olarak değerlendirildi. Bu nedenle, alt gruplar arasındaki değerlerin karşılaştırılması logaritmik homojenizasyon sonrası parametrik *ANOVA testi* ile yapılmıştır. Sonuç olarak; hem bFGF, hem Endostatin düzeylerinin Okuda klasifikasyon sistemi evreleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$) (Tablo 12, Şekil 7a,7b).

Tablo 12: Okuda klasifikasyon sistemi ile homojenize edilmiş grupların serum bFGF ve endostatin düzeyleri (geometrik mean) arasındaki ilişki

	Stage I	Stage II	Stage III	P value
logbFGF (pg/ml)	25.45	35.47	23.04	0.132
logEndostatin (ng/ml)	52.15	38.9	44.0	0.2



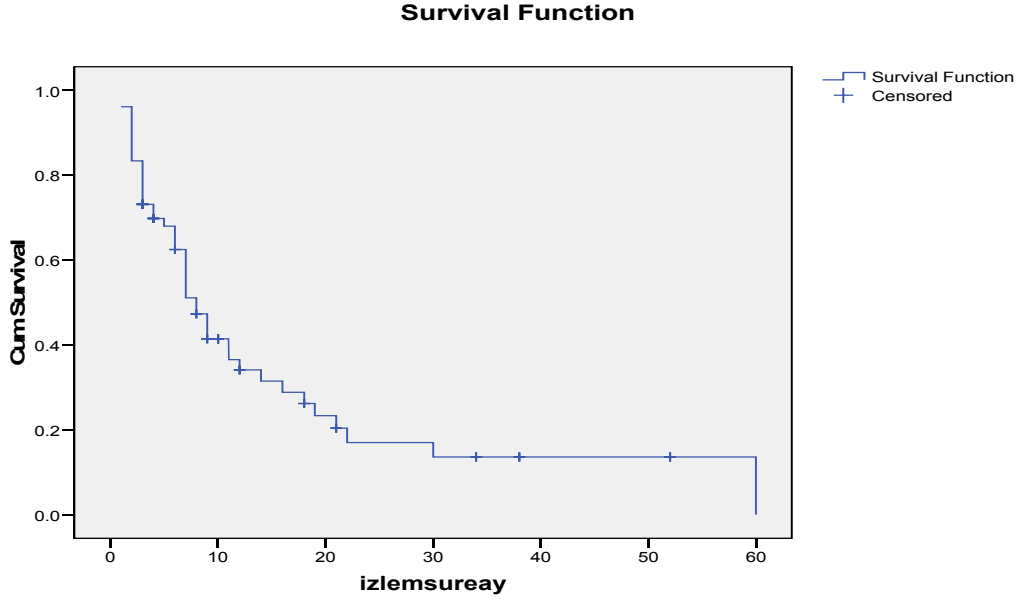
Şekil 7a: Okuda klasifikasyon sistemi ile serum bFGF (log) düzeyi arasındaki ilişki



Şekil 7b: Okuda klasifikasyon sistemi ile serum Endostatin (log) düzeyi arasındaki ilişki

Serum anjiyogenetik faktör düzeylerinin (VEGF, bFGF, Endostatin) diğer BCLC, ve CLIP klasifikasyon sistemleri ile karşılaştırılmalı değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$).

Çalışmaya katılan HCC hastalarının sağkalım analizi *Kaplan-Meier testi* ile yapıldı; ortalama yaşam süresi 15.97 ± 2.84 ay olarak saptandı (**Şekil 8**).

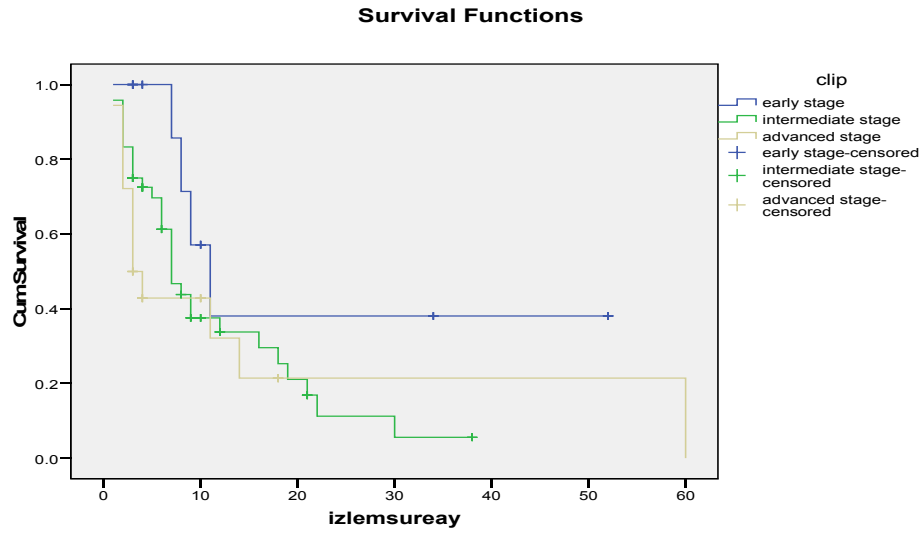
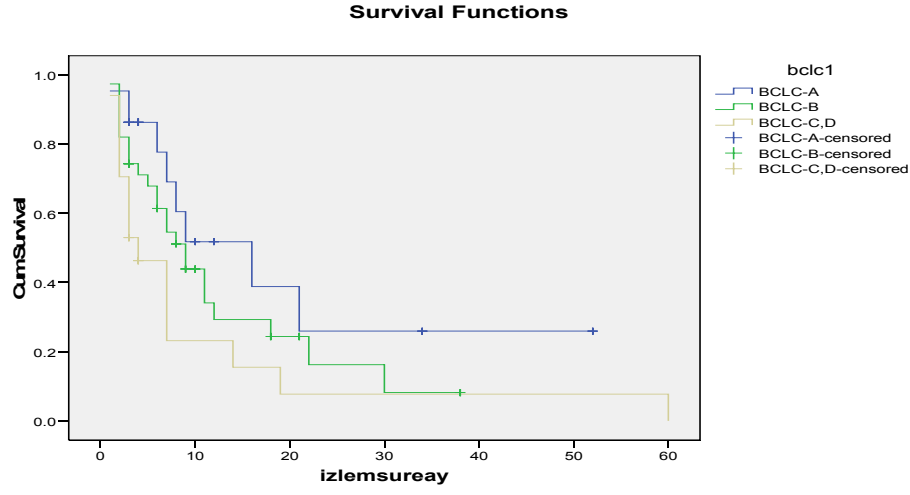
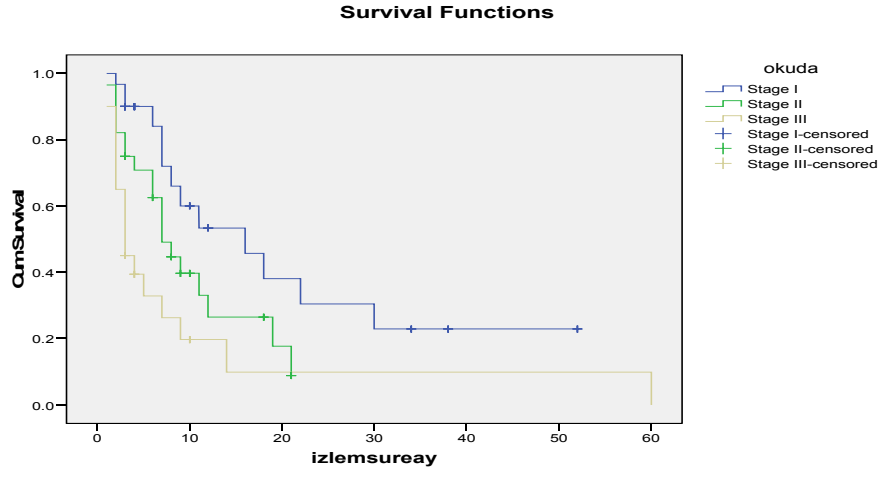


Şekil 8: HCC’de ortalama yaşam süresi

HCC evreleme sistemlerinin sağkalım üzerine etkisi *Median/Log Rank testi* ile değerlendirildi; Okuda klasifikasyon sisteminin olası yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$). BCLC klasifikasyonu sisteminin olası yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlılığa yakın ($P = 0.064$), CLIP klasifikasyon sisteminin olası yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P > 0.05$) (**Tablo 13, Şekil 9a,9b,9c**).

Tablo 13: HCC evreleme sistemleri ile tahmini yaşam süresi (Median/Log Rank)

	Erken evre	Orta evre	İleri evre	Overall	P value
BCLC (ay±SE)	16±5.71	9±1.52	4±1.29	8±0.92	0.064
Okuda (ay±SE)	16±5.13	7±1.13	3±0.56	8±0.92	0.004
CLIP (ay±SE)	11±2.09	7±0.92	3±0.80	8±0.92	0.112



Şekil 9a: Okuda klasifikasyonunun tahmini yaşam süresi ile ilişkisi

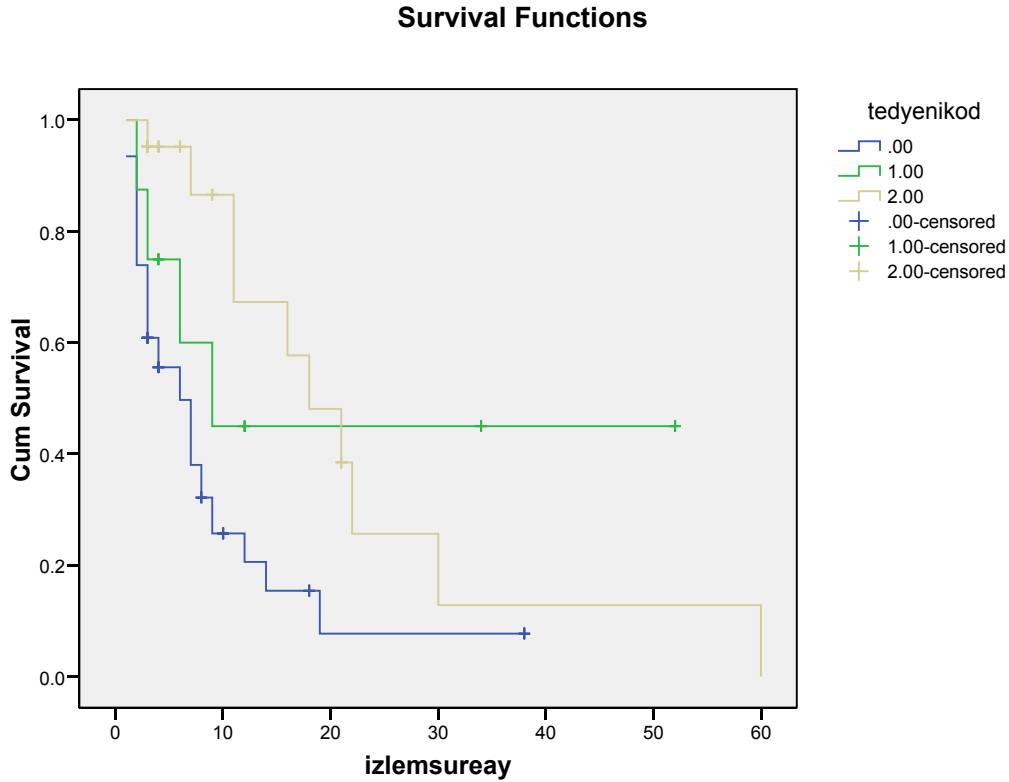
Şekil 9b: BCLC klasifikasyonunun tahmini yaşam süresi ile ilişkisi

Şekil 9c: CLIP klasifikasyonunun tahmini yaşam süresi ile ilişkisi

HCC’de uygulanan tedavi yöntemlerinin sağkalım üzerine etkisi *Median/Log Rank testi* ile değerlendirildi; Semptomatik tedavi uygulanan hastaların tahmini yaşam süresi 6 ± 1.33 ay, Cerrahi tedavi uygulanan hastalarda 9 ± 3.77 ay, Ablatif girişimler uygulanan hastalarda 18 ± 3.96 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$) (**Tablo 14, Şekil 10**).

Tablo 14: HCC’de uygulanan tedavi yöntemleri ile tahmini yaşam süresi (Median/Log Rank)

	Median (ay) $\pm$ SE	P value
Semptomatik tedavi	6 ± 1.33	0.002
Cerrahi tedavi	9 ± 3.77	
Ablatif girişimler	18 ± 3.96	
Overall	8 ± 0.98	

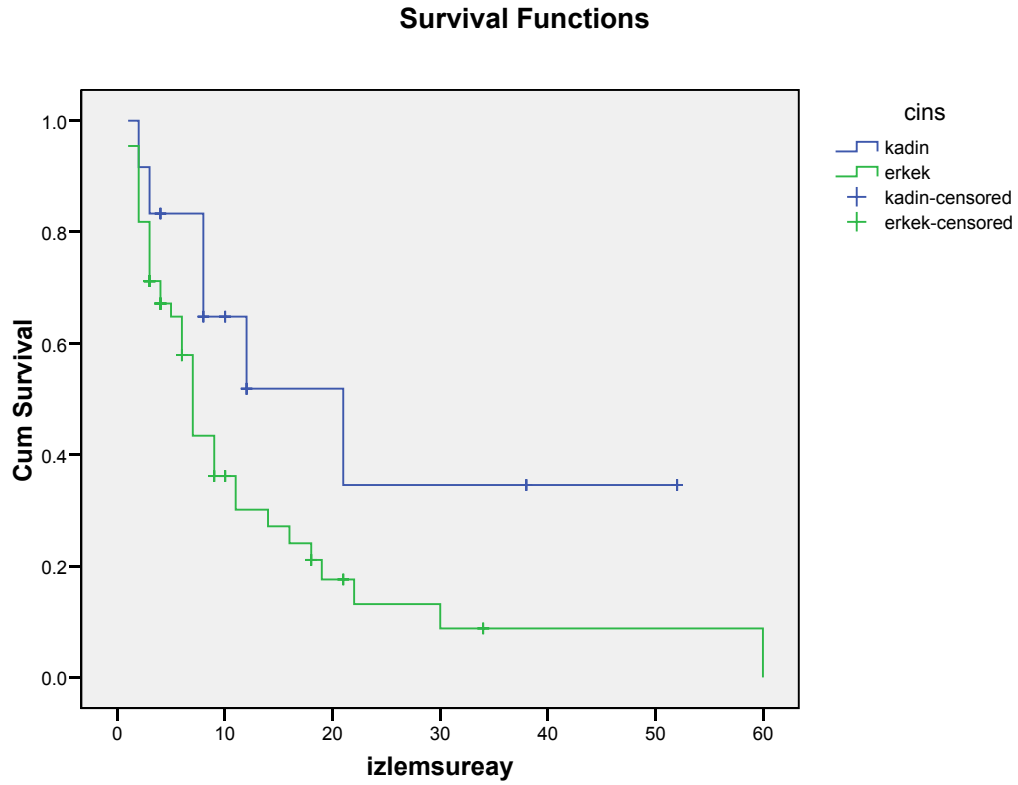


Şekil 10: HCC tedavi yöntemlerinin tahmini yaşam süresi ile ilişkisi (.00-semptomatik, 1.00-cerrahi, 2.00-ablatif girişimler)

HCC tanıli hastaların cinsiyet farklarının sağkalım üzerine etkisi *Median/Log Rank testi* ile değerlendirildi; kadın hastaların tahmini yaşam süresi 21 ± 7.65 ay, erkek hastaların ise 7 ± 0.49 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlılığa yakındı ($P= 0.071$) (**Tablo 15**, **Şekil 11**).

Tablo 15: HCC’de cinsiyet farkı ile tahmini yaşam süresi (Median/Log Rank)

Cinsiyet	Median (ay) $\pm$ SE	P value
Kadın	21 ± 7.65	0.071
Erkek	7 ± 0.49	
Overall	8 ± 0.92	

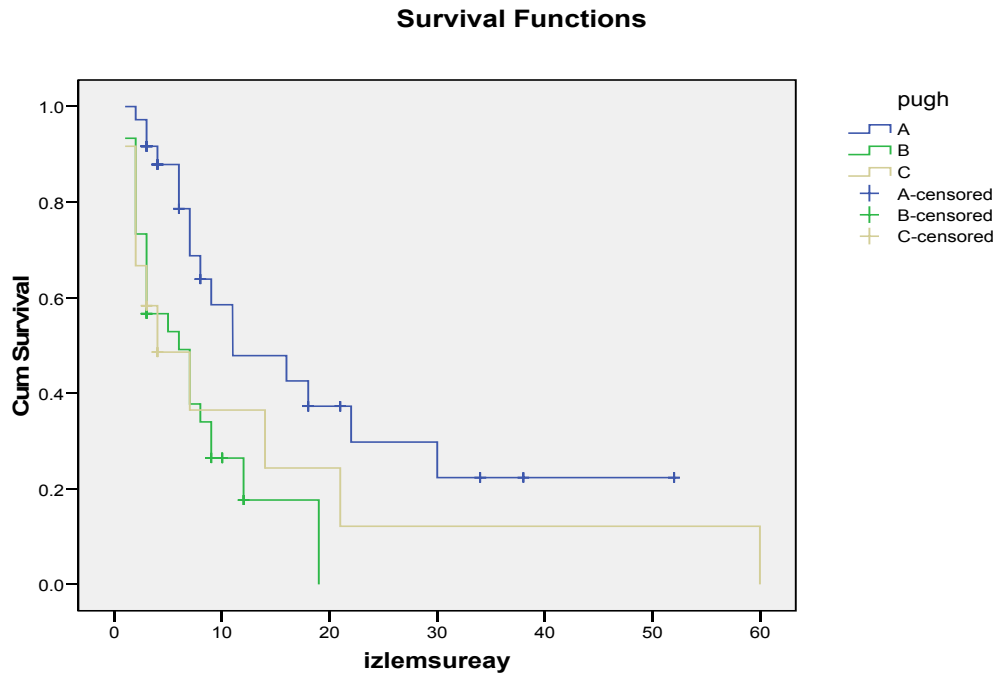


Şekil 11: HCC’de cinsiyet farkının tahmini yaşam süresi ile ilişkisi

HCC hastalarına uygulanan Child-Pugh klasifikasyon sisteminin sağkalım üzerine etkisi *Median/Log Rank testi* ile değerlendirildi; Child A sınıfı hastalarının tahmini yaşam süresi 11±4.82 ay, Child B sınıfında 6±1.97 ay, Child C sınıfında 4±2.71 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$) (**Tablo 16, Şekil 12**).

Tablo 16: HCC’de Child-Pugh klasifikasyonu ile tahmini yaşam süresi (Median/Log Rank)

Child-Pugh	Median (ay)±SE	P value
A	11±4.82	0.006
B	6±1.97	
C	4±2.71	
Overall	8±0.92	



Şekil 12: HCC’de Child-Pugh klasifikasyonunun yaşam süresi ile ilişkisi

Ayrıca, hastaların yaşı, HCC etyolojisi, HCC tanısı öncesi serum AFP değerinin 20 ng/ml’in altında olup olmaması durumunun sağkalım üzerine analizleri yapıldı; bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

5. TARTIŞMA

Tümör anjiyogenezi HCC’de prognoz açısından çok önemli bir faktördür. Anjiyogenetik ve anti-anjiyojenik büyüme faktörlerin serum düzeylerinin HCC’deki rolü hakkında yapılan pek çok çalışmalara rağmen bu faktörlerin önemi hala tartışılmaktadır. HCC için önerilen birçok evreleme sistemi mevcuttur ve son dönemde hangi evreleme sisteminin HCC için en iyi olduğu tartışılmaktadır. HCC’de ortak evreleme sisteminin olmaması HCC araştırmalarında erken tanı amaçlı biyomarker gelişiminde ve yeni tedavi seçenekleri geliştirme aşamasında eksikliklere sebep olabilmektedir. Uzmanlık tezi çalışmasındaki amacımız: a)HCC hastalarında anjiyogenetik (VEGF, bFGF) ve anti-anjiyogenetik faktörlerin (Endostatin) tümör evresi ve prognoz açısından öneminin belirlenmesi ve bu faktörlerin tümör gidişatını belirlemek açısından bağımsız belirteçler olup olamayacağının araştırılması, b) HCC tanısı alan hastalarda en çok kullanılan farklı evreleme sistemlerinin karşılaştırılarak en uygun evreleme sisteminin belirlenmesidir.

Çalışmaya hasta grubunda 71 erkek (%79.8), 18 kadın (%20.2) olmak üzere toplam 89 kişi alındı, kontrol grubunda (a) karaciğer siroz tanısı almış 14 erkek (%70), 6 kadın (%30) toplam 20 hasta ve (b) altta yatan herhangi bir karaciğer hastalığı olmayan 13 erkek (%65), 7 kadın (%35) toplam 20 kişi vardı. Her üç grup arasında bakılan tüm anjiyogenetik faktör düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ($P<0.05$). Gruplar arası yapılan istatistiksel değerlendirmede HCC hastalarında anjiyogenetik faktör düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre belirgin olarak farklı olduğu saptandı ($P<0.05$), buna ek olarak VEGF düzeyinin HCC grubunda siroz grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gösterildi ($P<0.05$). **Bu değerlerin daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile paralel bulunması, tümör vaskülaritesinin HCC hastalarında anjiyogenetik faktörlerin artışında rolü olduğunun bir göstergesidir. Bu bulguların sebep mi, yoksa sonuç mu olduğu konusu halen açıklığa ulaşmamış bir faktör olarak göz önüne alınmalıdır. Ayrıca bazı HCC tiplerinin daha hızlı seyretmesinin ve kötü prognozlu olmasının angiogenetik faktörler ile ilgili olup olmadığı halen belirgin değildir.**

Dipok Kumar Dhar ve arkadaşlarının yaptığı prospektif çalışmada, 33 HCC hastasında ameliyat öncesi ve sonraki dönem (post-op üçüncü hafta) serum VEGF, bFGF, endostatin düzeylerine bakılmış ve immunhistokimyasal olarak anjiyojenik skor ve endostatin lokalizasyonu değerlendirilmiş; serum endostatin ve bFGF düzeylerinde post-op dönemde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş saptanmıştır. VEGF ve endostatin arasında çok anlamlı ($P<0.0001$) korelasyon bulunmuştur. Anjiyojenik skor ile bFGF, VEGF’nin birlikte

pozitifliği, endostatin'in negatifliği arasında anlamlı pozitif korelasyon bulunmuştur ($P=0.0069$). Hayatta kalan hastaların sonraki dönemlerde bakılan endostatin düzeyleri anlamlı derecede yüksek seyretmiş ($P=0.0166$) ve bu hastaların sağkalımı diğerlerine göre iki kat daha uzun sürmüştür ($P=0.0871$) (144).

Makhlouf ve arkadaşlarının 76 erkek ve 14 kadın hastadan oluşan 90 kişinin dört gruba ayrıldığı çalışmasında (20 kişi sağlıklı kontrol grubu, 20 kronik hepatit hastası grubu, 30 karaciğer siroz hastası grubu, ve 20 HCC hastası grubu); kronik hepatit ve karaciğer siroz gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek VEGF düzeyleri saptanmıştır. Kronik hepatit, karaciğer sirozu, HCC'li hastalarda dolaşımdaki VEGF düzeylerinin kontrollerdeki düzeylerden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Karaciğer sirozu ile HCC arasında ise HCC grubunda istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmıştır (145).

Poon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, ameliyat öncesi 100 HCC hastasında serum VEGF düzeyleri, ve ameliyatla çıkartılan tümörlerde immunhistokimyasal yöntemle VEGF ekspresyonu değerlendirilmiş; yüksek serum VEGF düzeyinin tümör kapsül yokluğu, intrahepatik metastaz ve mikroskopik venöz invazyon varlığı, ve ileri evre ile uyumlu saptanmıştır. Serum VEGF düzeyi >500 pg/ml (kabuledilmiş cutoff düzey) olan hastaların venöz invazyon sıklığı bu değerin altında olanlara göre daha yüksek bulunmuştur, ayrıca ortalama 11.6 aylık takip sürecinde serum VEGF düzeyi >500 pg/ml olanların %48'inde, <500 pg/ml olanların %27'sinde post-op rekürens gelişmiştir (146). **Bizim çalışmamızda ise gruplar arası değerler istatistiksel olarak homojen dağılmadığından dolayı, değerler önce logaritmik olarak homojenize edildikten sonra geometrik mean olarak değerlendirildi, dolayısıyla cutoff değer elde etmek mümkün olmamıştır.**

Poon ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, ameliyat öncesi 108 HCC hastasında ve sağlıklı 20 kişiden oluşan kontrol grubunda serum VEGF ve endostatin düzeylerine bakılmış; serum VEGF düzeylerinde HCC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı fark saptanırken, serum endostatin düzeyinde anlamlı fark görülmemiştir. Multivariate analizlerde yüksek serum VEGF düzeyinin HCC'de bağımsız prognostik faktör olabileceği belirtilmiştir (147).

Hsu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 39 HCC hastası, karaciğer sirozlu 21 hasta, kronik hepatitli 22 hasta ve 40 sağlıklı kontrol gruplarında serum bFGF düzeyine bakılmış; HCC ve karaciğer siroz gruplarında diğer iki gruba göre anlamlı sonuçlar bildirilmiştir. Ayrıca HCC hastalarında yapılan multivariate analizde yüksek bFGF düzeyinin ileri tümör evresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (138).

Amr A El Meligi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 14 HCC hastası, kronik hepatitli 17 hasta, karaciğer sirozlu 23 hasta ve sağlıklı 11 kişilik kontrol gruplarında plazma bFGF düzeyine bakılmış; HCC grubunda diğer 3 gruba göre anlamlı sonuçlar bildirilirken, diğer üç grupta kendi aralarında istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, bFGF'nin HCC'de olası tümör markeri olabileceği, ve HCC tedavisinde olası yeni hedef olabileceği bildirilmiştir (139).

Bizim çalışmamızda, serum anjiyogenetik faktör düzeylerinin HCC'de evreleme amaçlı kullanılan klasifikasyon sistemleri (BCLC, Okuda, CLIP) ile ilişkisi değerlendirildi. Bu çalışma bu konuda farklı evreleme sistemleri ile angiogenetik faktörlerin bir arada incelendiği tek çalışmadır. Serum VEGF düzeyi ile Okuda klasifikasyon sistemi evreleri arasında istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildi ($P<0.05$). Okuda stage I ile stage III arasında serum VEGF düzeyi açısından istatistiksel anlamlı ($P<0.05$) sonuç gösterildi. Serum anjiyogenetik faktör düzeylerinin (VEGF, bFGF, endostatin) diğer BCLC, ve CLIP klasifikasyon sistemleri ile karşılaştırılmalı değerlendirilmesi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Okuda klasifikasyon sisteminde tümör boyutunu çok geniş bir eksen de değerlendirilmektedir, ve yüksek VEGF düzeyinin tümör boyutu ile ilişkili olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, tümörün VEGF ile ilişkisini saptamada Okuda klasifikasyon sisteminin BCLC ve CLIP sistemlerine göre daha iyi bir sistem olduğu görülmektedir. **VEGF'nin Okuda sisteminde evre I ile III arasında belirgin bir istatistiksel fark gösterirken (Tablo 11), evre I ile II arasında ise belirgin bir fark görülmemesi VEGF'nin erken evrelerde bir öneminin olmadığını göstermektedir.** Aynı evredeki hastalarda VEGF'nin prognostik bir önemi ise logistik regresyon analizlerinde saptanmamıştır. Bunun nedeni ise VEGF'nin prognostik önemini belirleyecek bir cutoff değerinin olmamasıdır. Yukarıdaki bulgularımıza benzer şekilde Jinno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 86 HCC hastası, kronik hepatitli 36 hastada, karaciğer sirozlu 77 hastada ve 20 kişiden oluşan sağlıklı kontrol gruplarında plazma VEGF düzeyine bakılmış; HCC grubunda diğer üç gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır, ayrıca HCC evrelemesine göre VEGF düzeyi değerlendirmesinde HCC Evre IVB hastalarında diğer evrelere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucunda yüksek VEGF düzeyinin HCC uzak metastazı açısından olası tümör marker olabileceği bildirilmiştir (148). Zhao ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, 115 HCC hastası, benign karaciğer tümörlü 40 hastada ve 30 kişilik sağlıklı kontrol grubunda serum VEGF düzeyine bakılmış; HCC grubunda diğer iki gruba göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır, ayrıca HCC grubunda yüksek VEGF düzeyinin portal venöz emboli, uzak metastaz ve büyük tümör boyutu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (149). **Her iki çalışmada ve bizim çalışmamızda**

olduğu gibi erken evrelerdeki hastalarda VEGF prognoz açısından bir bilgi sağlamamaktadır. Dolayısı ile ileri evrelerdeki belirgin artışın tümörün artan vaskülaritesi ile ilişkili olduğunu düşünebiliriz.

Çalışmaya katılan HCC hastalarının sağkalım analizi *Kaplan-Meier testi* ile yapıldı; ortalama yaşam süresi 15.97 ± 2.84 ay olarak saptandı. HCC evreleme sistemlerinin sağkalım üzerine etkisi değerlendirildi; Okuda klasifikasyon sisteminin tahmini yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P < 0.05$). BCLC klasifikasyonu sisteminin tahmini yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlılığa yakın ($P = 0.064$), CLIP klasifikasyon sisteminin tahmini yaşam süresi ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($P > 0.05$).

Literatürlerde, Marrero ve arkadaşlarının yaptığı, 01.01.2000-31.12.2003 tarihleri arasında takip edilen karaciğer siroz ve HCC tanılı toplam 239 hastanın dahil edildiği çalışmada, hastaların demografik bilgileri, tümör özellikleri, performans durumu, Child-Pugh klasifikasyonu, MELD skorlaması özelliklerinin sağkalım üzerine etkileri araştırılmış, bu bilgiler ışığında HCC’de kullanılan Okuda, CLIP, BCLC klasifikasyon sistemlerinin de bulunduğu yedi ayrı evreleme sistemleri karşılaştırılmıştır; hastaların performans statüsü, MELD skorunun >10 olması, portal ven trombozu mevcudiyeti, tümör çapının >4 cm olması durumlarının bağımsız tahmini sağkalım prediktörleri olduğu, ayrıca HCC tedavisinin tüm sağkalım üzerine önemli etkisinin olduğu bildirilmiştir. BCLC klasifikasyonunun bu özelliklerin çoğunu içerdiği için diğer evreleme sistemlerine göre tahmini sağkalımı belirlemede en iyi sistem olarak belirtilmiştir (71).

Toronto General Hospital’de ekim 1994- aralık 1998 tarihleri arası yapılan 257 HCC hastasının dahil edildiği retrospektif çalışmada, CLIP ile Okuda klasifikasyon sistemleri karşılaştırılmış; CLIP sisteminin Okuda’ya göre daha kolay uygulanabilirliği ve HCC evreleme sistemi olarak ta Okuda’dan daha iyi olduğu öne sürülmüştür (66).

İtalya’da yapılan, cerrahi tedavi dışında diğer tedavi yöntemleri (ablatif girişimler, TACE, semptomatik tedavi) uygulanan, 268 HCC hastasının dahil olduğu retrospektif çalışmada Okuda, CLIP, BCLC klasifikasyon sistemlerinin HCC’de tahmini sağkalımı belirlemesi açısından değerlendirilmişler; CLIP ve BCLC sistemlerinin erken-orta evre HCC’de Okuda’ya göre daha etkili oldukları, ayrıca BCLC’nin hastalığın çok erken evresinde prognozu belirlemede en iyi sistem olduğu belirtilmiştir (150). Bu çalışmalardan farklı olarak, uzmanlık tezi çalışmamızda Okuda klasifikasyonu sisteminin diğer BCLC, CLIP sistemlerine göre sağkalım üzerine daha iyi olduğu görüldü, CLIP sisteminin sağkalım üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. **Bizim çalışmamızda Okuda evrelesinin prognozu belirlemede daha iyi bir yöntem olarak bulunması diğer evreleme çalışmaları**

incelendiğinde beklenmeyen bir sonuçtur. Ancak Okuda evrelemesinin daha parametrik değerlere dayanıyor olması, karaciğer fonksiyon durumunu gösteren parametreleri içermesi, kullanım kolaylığı daha kesin şekilde hastaların ayrılması sonucunu doğurabilir. Örneğin BCLC evrelemesinde hastanın Child-Pugh skorunun C olması durumunda hasta ileri evre olarak değerlendirilmektedir. Fakat klinik deneyimlerimizden hastaların özellikle B ile C evrelerinin sık sık değiştiği görülmektedir (diüretik tedavisi, ensefalopatinin düzelmesi gibi). Bu da BCLC evrelemesinde hatalara yol açmaktadır. Son yıllarda MELD skorlaması da HCC prognozunda önemli bir unsur olarak görülmektedir.

Çalışmamızda, HCC’de uygulanan tedavi yöntemlerinin sağkalım üzerine etkisi değerlendirildi; semptomatik tedavi uygulanan hastaların tahmini yaşam süresi 6 ± 1.33 ay, cerrahi tedavi uygulanan hastalarda 9 ± 3.77 ay, ablatif girişimler uygulanan hastalarda 18 ± 3.96 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Cerrahi tedavide daha iyi bir yaşam süresinin görülmesi beklenebilirdi, bu sonuçta cerrahi sonrası artmış mortalitenin yaşam süresinin kısalmasında önemli bir yeri olduğunu düşünmekteyiz.

HCC’de tedavi yöntemi belirlemede, ve özellikle cerrahi tedavi uygulanacak hastaların olası komplikasyonlar açısından iyi değerlendirilmesi sağkalım açısından çok önemlidir.

HCC tanılı hastaların cinsiyet farklarının sağkalım üzerine etkisi değerlendirildi; kadın hastaların tahmini yaşam süresi 21 ± 7.65 ay, erkek hastaların ise 7 ± 0.49 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlılığa yakındı ($P= 0.071$). HCC’de yaşam süresinin erkeklerde kadınlara göre daha kısa olmasının nedeni olarak altta yatan komorbid hastalıkların ciddiyeti, yaşam tarzı özellikleri (alkol, sigara alışkanlıkları vs) ve erkeklerde daha ileri evrelerde teşhis konması gibi faktörler gösterilebilir.

HCC hastalarına uygulanan Child-Pugh klasifikasyon sisteminin sağkalım üzerine etkisi değerlendirildi; Child A sınıfı hastalarının tahmini yaşam süresi 11 ± 4.82 ay, Child B sınıfında 6 ± 1.97 ay, Child C sınıfında 4 ± 2.71 ay olarak saptandı, bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0.05$). Child-Pugh klasifikasyon sisteminin karaciğer fonksiyonel rezervini belirtmede çok önemli olduğu, dolayısıyla HCC’de sağkalım üzerine önemli etkisinin olduğunu söyleyebiliriz. Bu sonuçta BCLC evrelemesinin değerini göstermesi açısından önemli bir sonuçtur, ancak Child-Pugh evrelemesinin hastanın tedavisi süresince tekrarlayan defalar yapılması tedavi seçeneklerine karar vermede daha etkili olacaktır.

Ayrıca, çalışmamızda hastaların yaşı, HCC etyolojisi, HCC tanısı öncesi serum AFP değerinin 20 ng/ml ’in altında olup olmaması durumunun sağkalım üzerine analizleri yapıldı; bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$). Serum AFP değerinin

HCC’de tanıda yardımcı marker olabileceği, ancak hastalık progresyonu ve sağkalım üzerine önemli etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

6. SONUÇ

Bu çalışmada HCC hastalarında anjiyogenetik faktörlerin düzeyleri, bu faktörlerin prognoz üzerine etkili olup olmadığı ve farklı evrelemelerin yaşam süresi üzerine ayırd edici özellikleri araştırıldı.

1. Sonuç olarak başta VEGF olmak üzere diğer anjiyogenetik faktörlerin HCC hastalarında kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu gösterildi. Özellikle VEGF Okuda evrelemesinde ileri evrede erken evre ile karşılaştırıldığında belirgin olarak artış göstermekte, erken-orta evre veya orta-ileri evre arasında belirgin bir farklılık göstermemektedir. Bu sonuçlarla anjiyogenetik faktörlerin bir birine yakın evrelerde ya da aynı evrede olan hastalarda belirgin bir ayırd edici özellik göstermediğini söyleyebiliriz.
2. Anjiyogenetik faktörlerin tek başına veya bir arada prognostik bir faktör olmadıkları gösterildi.
3. Cinsiyet, Child-Pugh klasifikasyonu ve tedavi olmanın prognoza etki eden bağımsız faktörler oldukları bulundu.
4. İncelenen üç farklı evreleme sisteminden tahmini yaşam süresini en iyi ayırdeden sistemin Okuda evreleme sistemi olduğu belirlendi. BCLC sistemi ise HCC hastalarında yaşam süresine etki eden bağımsız bir faktör olan Child-Pugh klasifikasyonunu kullanması nedeni ile önemli bir evreleme sistemi olduğunu söyleyebiliriz. Ancak Child-Pugh klasifikasyonunun sık sık değişebileceği göz önüne alınarak tedavi yöntemleri belirlenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Munoz, N, Bosch, X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: Neoplasms of the Liver, Okuda, K, Ishak, KG (Eds), Springer, Tokyo 1989. p.3.
2. Muir, C, Waterhouse, J, Mack, T, et al. Cancer incidence in five continents. Vol. 5 (IARC publications, No. 88). International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1987.
3. Bosch, FX, Munoz, N. Hepatocellular carcinoma in the world: Epidemiologic questions. In: Etiology, Pathology and Treatment of Hepatocellular Carcinoma in America. Advances in Applied Technology Series, Tabor, E, DiBisceglie, AM, Purcell, RH (Eds), Gulf, Houston 1991. p.35.
4. Okuda, K. Epidemiology of primary liver cancer. In: Primary Liver Cancer in Japan, Tobe, T (Ed), Springer-Verlag, Tokyo 1992. p.3.
5. Cancer Incidence in five continents: IARC scientific publications volume VIII (No. 155), Parkin, DM (ed), Lyon: IARCPress 2002.
6. Skolnick, AA. Armed with epidemiologic research, China launches programs to prevent liver cancer (news). JAMA 1996; 276:1458.
7. Tanaka, H, Imai, Y, Hiramatsu, N, et al. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. Ann Intern Med 2008; 148:820.
8. El-Serag, HB, Davila, JA, Petersen, NJ, McGlynn, KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. Ann Intern Med 2003; 139:817.
9. Davila, JA, Morgan, RO, Shaib, Y, et al. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based study. Gastroenterology 2004; 127:1372.
10. El-Serag, H. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. Gastroenterology 2004; 127:S27.
11. Uzunalimoglu O, Yurdaydin C, Cetinkaya H, Bozkaya H, Sahin T, Colakoglu S, Tankurt E, Sarioglu M, Ozenirler S, Akkiz H, Tozun N, Degertekin H, Okten A. Risk factors for hepatocellular carcinoma in Turkey. Dig Dis Sci. 2001 May; 46(5):1022-8.
12. Beasley, RP, Lin, CC, Hwang, LY, Chien, CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: A prospective study of 22,707 men in Taiwan. Lancet 1981; 2:1129.
13. Colombo, M, de Franchis, R, Del Ninno, E, et al. Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis. N Engl J Med 1991; 325:675.

14. Tsukuma, H, Hiyama, T, Tanaka, S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med* 1993; 328:1797.
15. Prates, MD, Torres, FO. A cancer survey in Lourenco Marques, Portuguese East Africa. *J Natl Cancer Inst* 1965; 35:729.
16. Wong, R, Corley, DA. Racial and ethnic variations in hepatocellular carcinoma incidence within the United States. *Am J Med* 2008; 121:525.
17. Bralet, MP, Regimbeau, JM, Pineau, P, et al. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 2000; 32:200.
18. Bressac, B, Kew, M, Wands, J, Ozturk, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350:429.
19. Unsal, H, Yakicier, C, Marcais, C, et al. Genetic heterogeneity of hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:822.
20. Yan, RQ, Huang, DR, Gan, YC, et al. Human hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. Experimental induction of hepatocellular carcinoma in tree shrews exposed to hepatitis B virus and aflatoxin B1. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122:289.
21. Yu, SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10:674.
22. Ueno, Y, Nagata, S, Tsutsumi, T, et al. Detection of microcystins, a blue-green algal hepatotoxin, in drinking water sampled in Haimen and Fusui, endemic areas of primary liver cancer in China, by highly sensitive immunoassay. *Carcinogenesis* 1996; 17:1317.
23. Maki, A, Kono, H, Gupta, M, et al. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1182.
24. Suruki, RY, Mueller, N, Hayashi, K, et al. Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:2521.
25. Zaman, SN, Johnson, PJ, Williams, R. Silent cirrhosis in patients with hepatocellular carcinoma: Implications for screening in high-incidence and low-incidence areas. *Cancer* 1990; 65:1607.
26. Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. Liver Cancer Study Group of Japan. *Ann Surg* 1990; 211:277.

27. Yamada T, De Souza AT, Finkelstein S, et al. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate / insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:10351-10355.
28. Salvucci M, Lemoine A, Azoulay D, et al. Frequent microsatellite instability in posthepatitis B viral cirrhosis. *Oncogene* 1996; 13: 2681-2685.
29. Macdonald Graeme A. Pathogenesis of Hepatocellular carcinoma. *Clinics in liver disease* 2001; 5 (1), 69-85.
30. Sugano, S, Miyoshi, K, Suzuki, T, et al. Intrahepatic arteriovenous shunting due to hepatocellular carcinoma and cirrhosis, and its change by transcatheter arterial embolization. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:184.
31. Bruix, J, Castells, A, Calvet, X, et al. Diarrhea as a presenting symptoms of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 1990; 35:681.
32. Kew, MC. Tumors of the liver. In: *Hepatology: A textbook of liver disease*, Zakim, D, Boyer, T (Eds), WB Saunders Company, Philadelphia 1996. p.1513.
33. Lai, CL, Ng, RP, Hypokalemia, AS. The diagnostic value of the ratio of serum gamma-glutamyl transpeptidase to alkaline phosphatase in alcoholic liver disease. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17:41.
34. Yoon, KT, Kim, JK, Kim do, Y, et al. Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in detecting extrahepatic metastasis in pretreatment staging of hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1:104.
35. Wudel, LJ Jr, Delbeke, D, Morris, D, et al. The role of [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging in the evaluation of hepatocellular carcinoma. *Am Surg* 2003; 69:117.
36. Otegbayo, JA, Atalabi, OM, Yakubu, A. Clinicoradiologic and sonographic patterns of metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Med Assoc* 2006; 98:1620.
37. Yuki, K, Hirohashi, S, Sakamoto, M, et al. Growth and spread of hepatocellular carcinoma. A review of 240 consecutive autopsy cases. *Cancer* 1990; 66:2174.
38. Yang, Y, Nagano, H, Ota, H, et al. Patterns and clinicopathologic features of extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery* 2007; 141:196.
39. Aramaki, M, Kawano, K, Kai, T, et al. Treatment for extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma following successful hepatic resection. *Hepatogastroenterology* 1999; 46:2931.

40. Tonolini, M, Solbiati, L, Ierace, T, et al. Extrahepatic recurrence and second malignancies after treatment of hepatocellular carcinoma: spectrum of imaging findings. *Radiol Med (Torino)* 2002; 103:196.
41. Kew, MC, Dos Santos, HA, Sherlock, S. Diagnosis of primary cancer of the liver. *Br Med J* 1971; 4:408.
42. Schwartz, JM, Larson, AM, Gold, PJ, et al. Hepatocellular carcinoma: A one year experience at a tertiary referral center in the United States (abstract). *Hepatology* 1999; 30:278A.
43. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: A retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28:751.
44. Bruix, J, Sherman, M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42:1208.
45. Llovet, JM, Bustamante, J, Castells, A, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma. Rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999; 29:62.
46. Gogel, BM, Goldstein, RM, Kuhn, JA, et al. Diagnostic evaluation of hepatocellular carcinoma in a cirrhotic liver. *Oncology (Huntingt)* 2000; 14:15.
47. Wu, JT. Serum alpha-fetoprotein and its lectin reactivity in liver disease: A review. *Ann Clin Lab Sci* 1990; 20:98.
48. Collier, J, Sherman, M. Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27:273.
49. Lok, AS, Lai, CL. Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: Role in the early detection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989; 9:110.
50. Weitz, IC, Liebman, HA. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: A critical review. *Hepatology* 1993; 18:990.
51. Nakamura, S, Nouse, K, Sakaguchi, K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:2038.
52. Aoyagi, Y, Oguro, M, Yanagi, M, et al. Clinical significance of simultaneous determinations of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in monitoring recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996; 77:1781.

53. Robbins, S, Kumar, V. Basic Pathology, 4th ed, WB Saunders, Philadelphia 1987. p.598.
54. Okuda, K, Ohtsuki, T, Obata, H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56:918.
55. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology* 2000; 31:840.
56. Tang, ZY. Liver cancer. In: *Manual of Clinical Oncology*, Pollock, RE (Ed), Wiley-Liss, Inc., New York 1999. p.407.
57. Primack, A, Vogel, CL, Kyalwazi, SK, et al. A staging system for hepatocellular carcinoma: prognostic factors in Ugandan patients. *Cancer* 1975; 35:1357.
58. Lai, CL, Lam, KC, Wong, KP, et al. Clinical features of hepatocellular carcinoma: review of 211 patients in Hong Kong. *Cancer* 1981; 47:2746.
59. Ikai, I, Yamaoka, Y, Yamamoto, Y, et al. Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis: Proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 1998; 227:433.
60. Vauthey, JN, Lauwers, GY, Esnaola, NF, et al. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:1527.
61. Ishak, K, Baptista, A, Bianchi, L. et al., Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22:696.
62. Nzeako, UC, Goodman, ZD, Ishak, KG. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic and noncirrhotic livers. A clinico-histopathologic study of 804 North American patients. *Am J Clin Pathol* 1996; 105:65.
63. Kosuge, T, Makuuchi, M, Takayama, T, et al. Long-term results after resection of hepatocellular carcinoma: experience of 480 cases. *Hepatogastroenterology* 1993; 40:328.
64. Bilimoria, MM, Lauwers, GY, Doherty, DA, et al. Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2001; 136:528.
65. Farinati, F, Rinaldi, M, Gianni, S, Naccarato, R. How should patients with hepatocellular carcinoma be staged? Validation of a new prognostic system. *Cancer* 2000; 89:2266.

66. Levy, I, Sherman, M. Staging of hepatocellular carcinoma: assessment of the CLIP, Okuda, and Child-Pugh staging systems in a cohort of 257 patients in Toronto. *Gut* 2002; 50:881.
67. Ueno, S, Tanabe, G, Sako, K, et al. Discrimination value of the new western prognostic system (CLIP score) for hepatocellular carcinoma in 662 Japanese patients. *Hepatology* 2001; 34:529.
68. Villa, E, Colantoni, A, Camma, C, et al. Estrogen receptor classification for hepatocellular carcinoma: comparison with clinical staging systems. *J Clin Oncol* 2003; 21:441.
69. Cho, YK, Chung, JW, Kim, JK, et al. Comparison of 7 staging systems for patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial chemoembolization. *Cancer* 2008; 112:352.
70. Llovet, JM, Bru, C, Bruix, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19:329.
71. Marrero, JA, Fontana, RJ, Barrat, A, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* 2005; 41:707.
72. Cillo, U, Vitale, A, Grigoletto, F, et al. Prospective validation of the Barcelona Clinic Liver Cancer staging system. *J Hepatol* 2006; 44:723.
73. Bruix, J, Llovet, JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 35:519.
74. Figueras, J, Jaurrieta, E, Valls, C, et al. Survival after liver transplantation in cirrhotic patients with and without hepatocellular carcinoma: A comparative study. *Hepatology* 1997; 25:1485.
75. Min, AD, Saxena, R, Thung, SN, et al. Outcome of hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma undergoing liver transplant. *Am J Gastroenterol* 1998; 93:2148.
76. Molmenti, EP, Klintmalm, GB. Liver transplantation in association with hepatocellular carcinoma: An update of the International Tumor Registry. *Liver Transpl* 2002; 8:736.
77. Yoo, HY, Patt, CH, Geschwind, JF, Thuluvath, PJ. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 2003; 21:4329.
78. Wong, SN, Reddy, KR, Keeffe, EB, et al. Comparison of clinical outcomes in chronic hepatitis B liver transplant candidates with and without hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2007; 13:334.

79. Tanabe, KK, Curley, SA, Dodd, GD, Siperstein, AE. Radiofrequency ablation. *Cancer* 2004; 100:641.
80. Chen, MS, Li, JQ, Zheng, Y, et al. A Prospective Randomized Trial Comparing Percutaneous Local Ablative Therapy and Partial Hepatectomy for Small Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg* 2006; 243:321.
81. Lu, MD, Kuang, M, Liang, LJ, et al. [Surgical resection versus percutaneous thermal ablation for early-stage hepatocellular carcinoma: a randomized clinical trial]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86:801.
82. Ohnishi, K, Nomura, F, Ito, S, Fujiwara, K. Prognosis of small hepatocellular carcinoma (less than 3 cm) after percutaneous acetic acid injection: Study of 91 cases. *Hepatology* 1996; 23:994.
83. Liang, HL, Yang, CF, Pan, HB, et al. Small Hepatocellular Carcinoma: Safety and Efficacy of Single High-Dose Percutaneous Acetic Acid Injection for Treatment. *Radiology* 2000; 214:769.
84. Llovet, JM, Ricci, S, Mazzaferro, V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359:378.
85. Abou-Alfa, GK, Johnson, P, Knox, J, et al. Final results from a phase II, randomized, double-blind study of sorafenib plus doxorubicin versus placebo plus doxorubicin in patients with advanced hepatocellular carcinoma (abstract). Data presented at the 2008 ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, Orlando FL, January 25-27, 2008.
86. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, Hsu H, Wu TC, Kong MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Eng J Med* 1997; 336: 1855-1859.
87. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, Takeda T, Fukuda K, Tamori A, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 2001; 357: 196-197.
88. Valla DC, Chevallier M, Marcellin P, Payen JL, Trepo C, Fonck M, et al. Treatment of hepatitis C virus-related cirrhosis: a randomized, controlled trial of interferon alfa-2b versus no treatment. *Hepatology* 1999; 29: 1870-1875.
89. Pinedo HM et al. Translational research: The role of VEGF in tumorangiogenesis. *The oncologist* 2000; 5:1-2.
90. Goodsell DS. The molecular perspective: VEGF and angiogenesis. *Stem Cells*. 2003; 21: 118-119.

91. Lawrence WT, Diegelmann RF. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol*. 1994; 12: 157-169.
92. Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer*. 1996; 32A: 2423-2429.
93. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
94. Timar J, Dome B, Fazekas K, et al. Angiogenesis-Dependent Disorders and Angiogenesis Therapy. *Path Onco Resea* 2001; 2: 85-94.
95. Bergers G and Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 401-410.
96. Matsui K, Yoshioka T, Murakami Y, et al. Serum Concentrations Of Vascular Endothelial Growth Factor And Monocyte-Colony Stimulating Factor In Peripheral Arterial Disease. *Circ J* 2003; 67: 660-662.
97. Grosman J, Grosman W. Angiogenesis. *Rev In Card Med* 2002, Vol 3: 138-144.
98. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996; 271: 603-6.
99. Veikkola T et al. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 211-220.
100. Neufeld G et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13: 9-22.
101. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35.
102. Yancopoulos GD et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
103. Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1017-1021.
104. Wei M et al. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, at chromosome 6p12. *Hum. Genet*. 1996; 97: 794-797.
105. Mattei MG et al. Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor(PIGF) genes to human chromosome 6p12 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics* 1996; 32: 168-169.
106. Ferrara N et al. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
107. Zachary I et al. Signalling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 568-581.

108. Ferrara N et al. Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol* 2001; 280: 1358-1366.
109. Nalbandian A et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod* 2003; 69: 985-994.
110. Wollenhaupt K et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R), vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) systems in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation. *Reprod Dev* 2004; 50:269-278.
111. Dvorak, HF, Brown, LF, Detmar, M, Dvorak, AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146: 1029-39.
112. Ria R, Roccaro AM, Merchionne F et al. Vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 1961-1966.
113. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M et al. Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies. *Angiogenesis* 2002; 5: 237-256.
114. Bates DO, Hillman NJ, Williams B et al. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002; 200: 587-597.
115. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrin Rev* 1997; 18: 4-25.
116. Sato TN, Qin Y, Kozak CA et al. Tie-1 and Tie-2 define another class of putative receptor tyrosinase kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 9355-9358.
117. Suri C, Jones PF, Patan S et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie-2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87: 1171-1180.
118. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD et al. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998; 8: 529-532.
119. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: Much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995; 13: 765-782.
120. Li XM, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhou J, Sun HC. Serum vascular endothelial growth factor is a predictor of invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 511-517.

121. Niu Q, Tang ZY, Ma ZC, Qin LX, Zhang LH. Serum vascular endothelial growth factor is a potential biomarker of metastatic recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 565-568.
122. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65(3): 671-80.
123. Schwartz JD, Schwartz M, Lehrer D, et al. Bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma (HCC) for patients without metastasis and without invasion of the portal vein. *J Clin Oncol*, 2006 Proc Am Soc Clin Oncol 2006; 24: 213s (abstr 4144).
124. Malka D, Dromain C, Farace F, et al. Bevacizumab in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): Preliminary results of a phase II study with circulating endothelial cell (CEC) monitoring. *J Clin Oncol* 2007 Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 215s (abstr 4570).
125. Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, et al. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(12):1898-903.
126. Thomas MB, Chadha R, Iwasaki M, Glover K, Abbruzzese JL. The combination of bevacizumab (B) and erlotinib (E) shows significant biological activity in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* 2007 Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 214s (abstr 4567).
127. Sun W, Haller DG, Mykulowycz K, et al. Combination of capecitabine, oxaliplatin with bevacizumab in treatment of advanced hepatocellular carcinoma (HCC): a phase II study. *J Clin Oncol* 2007 Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 214s (abstr 4574).
128. Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, et al. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24(26): 293-300.
129. Kanai F, Yoshida H, Teratani T, et al. New feasibility study design with hepatocellular carcinoma: A phase I/II study of TSU-68, an oral angiogenesis inhibitor. *J Clin Oncol* 2006 Proc Am Soc Clin Oncol 2006; 24: 213s (abstr 4145).
130. Zhu AW, Sahani DV, di Tomaso E, et al. A phase II study of sunitinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2007 Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 231s (abstr 4637).
131. Faivre SJ, Raymond E, Douillard J, et al. Assessment of safety and drug-induced tumor necrosis with sunitinib in patients (pts) with unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Clin Oncol* 2007 Proc Am Soc Clin Oncol 2007; 25: 149s (abstr 3546).

132. Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z (1990). "Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis". *Cancer Metastasis Rev* 9 (3): 203-26.
133. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 1992; 116: 435-9.
134. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1: 207-235.
135. Peeper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824-31.
136. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, et al. Compensation by fibroblast growth factor-1 (FGF-1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF-2 null mice. *Mol n Cell Biol* 2000; 20: 2260-68.
137. Mentelein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumor therapy? *Naturewissenschaften* 2003; 90: 385-94.
138. Hsu PI, Chow NH, Yang HB et al., (1997): Implications of serum basic fibroblast growth factor levels in chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*; 17(4A): 2803-9.
139. Amr A El Meligi, Abir Zakaria, Mohamed I El Khodari*, Hadi El Khodari*, Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) in Hepatocellular carcinoma and benign chronic liver disease, *Sci.Med.J.ESCME*, Vol. 16, No. 4, Oct. 2004.
140. Beck, L. and D'Amore, P.A. 1997. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, 11: 365–373.
141. Olsen, B.R. 1999. Life without perlecan has its problems. *J. Cell. Biol.*, 147: 909–911.
142. Musso O, Rehn M, Theret N, et al. Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 2001; 61:45-49.
143. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997; 88:277-285.
144. Dipok Kumar Dhar, Takashi Ono, Akira Yamanoi, Yukiko Soda, Emi Yamaguchi, Atikur Rahman, Hitoshi Kohno, Naofumi Nagasue. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *American Cancer Society.* 2002; 95(10): 2188-2195.

145. Makhoul MM et al. Vascular endothelial growth factor level in chronic liver diseases. *J Egypt Soc Parasitol.* 2002; 32: 907-21.
146. Poon RT, Ng IO, Lau C, et al. Serum vascular endothelial growth factor predicts venous invasion in hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Ann Surg.* 2001; 2: 227-35.
147. Poon RT, Ho JW, Tong CS, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* 2004 Oct;91(10):1354-60.
148. Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, et al. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 1998 Jun; 33(3): 376-82.
149. Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl).* 2003 May; 116(5): 772-6.
150. Grieco A, Pompili M, Caminiti G, Miele L, Covino M, Alfei B, Rapaccini GL, Gasbarrini G. Prognostic factors for survival in patients with early-intermediate hepatocellular carcinoma undergoing non-surgical therapy: comparison of Okuda, CLIP, and BCLC staging systems in a single Italian centre. *Gut.* 2005 Mar; 54(3):411-8.