

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER SİROZU MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA  
VEGF RESEPTÖR-2 İNHİBİTÖRÜ SU 1498' İN ANJİYOGENEZ  
VE APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Gonca MENGÜÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç.Dr. Necmiye CANACANKATAN

Mersin – 2016

T.C.  
MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KARACİĞER SİROZU MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA  
VEGF RESEPTÖR-2 İNHİBİTÖRÜ SU 1498'İN ANJİYOGENEZ VE  
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Gonca MENGÜÇ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç.Dr. Necmiye CANACANKATAN

Bu Tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE  
BK (GT) 2011-3YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:313

Mersin – 2016

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

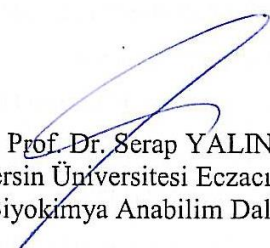
Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Karaciğer sirozu modeli oluşturulmuş sıçanlarda VEGF reseptör-2 inhibitörü SU 1498’ in anjiyogenez ve apoptozis üzerine etkisi” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22.07.2016



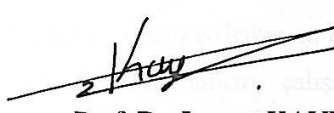
Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Serap YALIN  
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı


Jüri Üyesi



Prof. Dr. Levent KAYRIN  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08.08.2016 tarih ve 2016/303 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü  
Prof. Dr. Banu ÇÖŞKUN YILMAZ



## TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalındaki yüksek lisans eğitimim süresince, değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her türlü desteğini sabırla gösteren, benim için en iyi çalışma ortamını hazırlayan, gerek akademik gerekse aile yaşamı ile örnek aldığım değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Necmiye CANACANKATAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri; Prof. Dr. Serap YALIN, Doç. Dr. Erdinç YALIN ve Yrd. Doç. Dr. Zeynep Nil ÜNAL' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecince desteklerini gördüğüm çalışma arkadaşlarım Oğuz Emre GÜL ve Arş. Gör. Ayşegül GÖRÜR' e teşekkür ederim.

Histopatolojik incelemelere katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Figen DORAN, Uzman DR. Kıvılcım EREN ERDOĞAN ve teknisyen Kezban BOSTANER' e, ayrıca istatistiksel verilerin değerlendirilmesine katkıda bulunan Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulundan Öğr. Gör. Sema ERDEN ERTÜRK' e teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında deney hayvanlarının temin ve bakımını üstlenen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına katkılarından dolayı ayrı ayrı teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarını ve sevgilerini her zaman hissettiren eşim Emir MENGÜÇ, babam Osman TEKE, annem Lütfiye TEKE ve kardeşim Günseli TEKE' ye güvenleri ve destekleri için sonsuz teşekkür ederim. Yüksek Lisans eğitimim sırasında hayatıma katılan sevgili oğlum Ömer Ege MENGÜÇ' e varlığından dolayı teşekkür ederim. Varlığıyla hayatıma renk katan sevgili yeğenim Hatice Ceren TURGUT' a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı BAP-SBE BK (GT) 2011-3YL nolu proje olarak destekleyen Mersin Üniversitesi Rektörlüğüne ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ayrıca teşekkür ederim.

YL. Öğr. Gonca MENGÜÇ

MERSİN / 2016

# İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET .....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer Sirozu .....	3
2.1.1. Karaciğer Sirozu Etiyolojisi .....	4
2.1.2. Karaciğer Sirozu Morfolojisi .....	5
2.1.3. Karaciğer Sirozu Patogenezi ve Fibroz.....	7
2.1.4. Karaciğer Sirozunda Klinik ve Tanı.....	9
2.2. Anjiyogenez .....	10
2.2.1. Anjiyogenez Kavramı .....	10
2.2.2. Anjiyogenez Mekanizması.....	12
2.2.3. Anjiyogenik Faktörler .....	15
2.2.3.1. Proanjiyogenik Faktörler .....	17
2.2.3.1.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü.....	17
2.2.3.1.2. Anjiyopoetinler ve Tie Reseptörleri .....	24
2.2.3.1.3. Fibroblast Büyüme Faktörü .....	25
2.2.3.2. Antianjiyogenik faktörler .....	25
2.2.3.2.1. Trombospondin-1 .....	25
2.2.3.2.2. Angiostatin .....	26
2.2.3.2.3. Endostatin .....	26
2.2.4. Fizyolojik ve Patolojik Anjiyogenez.....	26
2.2.4.1. Fizyolojik Anjiyogenez .....	26

2.2.4.2. Patolojik Anjiyogenez .....	27
2.2.5. Anjiyogenez ve Metastaz İlişkisi .....	28
2.2.6. Anjiyogenezin Siroz ve Hepatoselüler Karsinomayla İlişkisi .....	29
2.3. Apoptozis .....	31
2.3.1. Apoptozis Kavramı .....	31
2.3.2. Apoptozisin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	33
2.3.3. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	35
2.3.4. Apoptozisin Moleküler Mekanizmaları ve Yol İzleri .....	36
2.3.4.1. Kaspazlar .....	37
2.3.4.1.1. Başlatıcı Kaspazlar .....	37
2.3.4.1.2. Efektör Kaspazlar .....	38
2.3.4.2. Kaspaz Regülatörleri .....	39
2.3.4.3. Bcl-2 Ailesi.....	40
2.3.4.4. İntrensek (Mitokondri Aracılı ) Yol İzi .....	41
2.3.4.5. Ekstrensek (Ölüm Reseptörleri Aracılı) Yol İzi .....	42
2.4. SU 1498.....	44
2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem.....	44
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>46</b>
3.1. Gereçler.....	46
3.1.1. Cihazlar .....	46
3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler .....	47
3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Temini .....	47
3.3. Çalışma Grupları .....	48
3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı.....	50
3.4.1. Doku örnekleri.....	50
3.5. Analiz Yöntemleri.....	50
3.5.1. Biyokimyasal Analizler.....	50
3.5.1.1. Apoptozis ve Anjiyogenez Belirteçlerinin İncelenmesi .....	50
3.5.1.1.1. Kaspaz-3, 8, 9 ve VEGFR-2 Gen Ekspresyon Ölçüm Yöntemi. ....	50
3.5.1.2. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi.....	51
3.5.1.2.1. Doku GSH Ölçümü .....	51

3.5.1.2.2. Doku MDA Ölçümü .....	52
3.5.1.3. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini .....	53
3.5.2. Histopatolojik İnceleme .....	55
3.5.3. İstatistiksel Analizler .....	56
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>57</b>
4.1. Biyokimyasal Bulgular .....	57
4.1.1. Apoptozis ve Anjiyogenez Belirteçlerine Ait Bulgular .....	57
4.1.1.1. Kaspaz-3, -8, -9 Gen Ekspresyon Düzeyi .....	57
4.1.1.2. VEGFR-2 Gen Ekspresyon Düzeyi .....	59
4.1.2. Antioksidan Kapasite .....	60
4.1.2.1. Doku GSH Düzeyleri .....	60
4.1.2.2. Doku MDA Düzeyleri.....	61
4.2. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular .....	63
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>67</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>75</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>76</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>86</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İlerlemiş karaciğer sirozunda nodül oluşumu. Tipik karaciğer siroz morfolojisinde MR görüntüsü .....	6
Şekil 2.2. Normal ve hasarlı karaciğerde hepatik karaciğer hücreleri ve hepatik sinüzoid. ....	8
Şekil 2.3. Vaskülogenez ve anjiyogenezde yeni damar formasyonu. ....	12
Şekil 2.4. Anjiyogenezin Evrelerinin Gösterimi .....	14
Şekil 2.5. VEGF ailesinin VEGF reseptörleri ile etkileşimi.....	21
Şekil 2.6. VEGF-A Varlığında ve Yokluğunda Farklılaşan Hücreler .....	23
Şekil 2.7. Ang-1 ve Ang-2 nin Tie-2 reseptörü aracılığıyla fizyolojik rolleri.....	25
Şekil 2.8. Anjiyogenez ve Tümör Metastazı İlişkisi .....	28
Şekil 2.9. Apoptozis sürecinde hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler .....	34
Şekil 2.10. Apoptoziste intrinsek yol izi .....	42
Şekil 2.11. Apoptoziste ekstrinsek yol izi.....	43
Şekil 2.12. SU 1498; [(E)-3-(3,5-Diisopropyl-4-hydroxyphenyl)-2-[(3-phenyl-n-propyl) aminocarbonyl] acrylonitrile]. ....	44
Şekil 4.1. Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. ....	59
Şekil 4.2. Anjiyogenez belirteci olan VEGFR-2 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi. ....	60
Şekil 4.3. GSH düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. ....	61
Şekil 4.4. MDA düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. ....	62
Şekil 4.5. Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü .....	64
Şekil 4.6. Siroz grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü .....	64
Şekil 4.7. DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü .....	65
Şekil 4.8. Siroz+SU 1498 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü .....	65

<b>Şekil 4.9.</b> Siroz+SU 1498 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü.....	66
<b>Şekil 4.10.</b> Siroz sonrasında+SU 1498 (III) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü.....	66
<b>Şekil 5.1.</b> Hasarlı karaciğer dokusunun antiapoptotik mekanizması.....	74



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Karaciğer Sirozu Etiyolojisi .....	4
<b>Çizelge 2.2.</b> Karaciğer Sirozunun Ülkemizdeki Etiyoloji Oranları.....	5
<b>Çizelge 2.3.</b> Proanjyogenik ve Antianjyogenik Faktörler .....	16
<b>Çizelge 2.4.</b> Apoptozis ve nekrozis arasındaki farklar .....	36
<b>Çizelge 4.1.</b> Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.....	58
<b>Çizelge 4.2.</b> Anjiyogenez belirteçlerden olan VEGFR-2 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.....	59
<b>Çizelge 4.3.</b> GSH düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi .....	61
<b>Çizelge 4.4.</b> MDA düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi.....	62

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
aFGF	Asidik fibroblast büyüme faktörü ( <i>Acidic Fibroblast Growth Factor</i> )
AIF	Apoptozis indükleyici faktör ( <i>Apoptosis-inducing factor</i> )
Ang-1	Anjiyopoetin-1
Ang-2	Anjiyopoetin-2
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ( <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> )
ATP	Adenozin trifosfat
Bax	Bcl-2 ilişkili X proteini ( <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2 ( <i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i> )
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü ( <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> )
BH1	Bcl-2 homoloji alanı 1 ( <i>Bcl-2 homology-1</i> )
Bid	Bcl-2 ile etkileşen protein ( <i>Bcl-2 interacting protein</i> )
bp	Baz çifti ( <i>Base Pairs</i> )
Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CAD	Kaspazla aktive olan DNaz ( <i>Caspase Activated DNase</i> )
CARD	Kaspazları organize eden bölge ( <i>Caspase recruitment domain</i> )
CAT	Katalaz ( <i>Catalase</i> )
Cdk	Siklin bağlı kinaz
c-FLIP	(FADD-like IL-1 $\beta$ converting enzyme) inhibitory protein
CHOP	C/EBP homolog protein
CO	Karbonmonoksit
CPP32	Kaspaz-3
Cyt-C	Sitokrom-C
DD	Ölüm Bölgesi ( <i>Death Domain</i> )

DED	Ölüme yardımcı olan bölge ( <i>Death effector domain</i> )
DEN	N-nitrozodietilamin
DISC	Ölümü uyaran sinyal kompleksi ( <i>Death inducing signalling complex</i> )
DR	Ölüm Reseptörü ( <i>Death Receptor</i> )
DR3	Ölüm Reseptörü 3 ( <i>Death receptor-3, TRAMP/WSL-1/APO3/LARD</i> )
DR4	Ölüm Reseptörü 4 ( <i>Death receptor4, TRAIL-R1</i> )
DR5	Ölüm Reseptörü 5 ( <i>Death receptor-5, APOP2/TRAIL-R2/KILLER</i> )
DR6	Ölüm Reseptörü 6 ( <i>Death receptor-6</i> )
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz ( <i>Endothelial nitric oxide synthase</i> )
ER	Endoplazmik Retikulum ( <i>Endoplasmic reticulum</i> )
ERK	Ekstrasellüler regüle kinaz.
ESI MS	Elektrospray İyonizasyon Kütle Spektrometrisi ( <i>Electrospray Ionisation MS</i> )
FADD	Fas ile ilişkili ölüm bölgesi ( <i>Fas associated death domain</i> )
FasL	Fas ligand
FLICE	Kaspaz-8
FOXOS	Forkhead box proteini O
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GGT	Gama glutamil transferaz
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz ( <i>Glutathione Peroxidase</i> )
GST	Glutatyon S transferaz ( <i>Glutathione S-transferase</i> )
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit ( <i>Hydrogen Peroxide</i> )
HBV	Hepatit B virüsü
HCC	Hepatosellüler Karsinom ( <i>Hepatocellular Carcinoma</i> )

HCV	Hepatit C virüsü
HDAC	Histon deasetilaz
HGF	Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
HIFs	Hipoksi indüklü faktör ( <i>Hipoxia-inducible factor</i> )
HIMF	Hipoksi indüklü mitojenik faktör
IAP	Apoptozisi inhibe eden protein ( <i>Inhibitors of apoptosis protein</i> )
ICAD	CAD inhibitörü ( <i>Inhibitor of CAD</i> )
ICE	İnterlökin-1-beta dönüştürücü enzim ( <i>Interleukin-1<math>\beta</math>-Converting Enzyme</i> )
IG	İmmünglobulin
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
I $\kappa$ B $\alpha$	I kappa B alfa
JNK	C-Jun N-terminal kinase
Kb	Kilo baz
kDa	Kilodalton
MDA	Malondialdehit
Mdm2	<i>Murine double minute 2 protein</i>
MFG-E8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein
MKK	Aktif mitojen protein kinaz
MMPs	Metalloproteinazlar
MPTP	Mitokondriyal permeabilite geçiş poru ( <i>Mitochondrial permeability transition</i> )
MR	Manyetik Rezonans
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör kappa B
O <sub>2</sub>	Moleküler oksijen
PARP	Poli ADP Riboz Polimeraz ( <i>Poly ADP-ribose polymerase</i> )
PCNA	Prolifere hücre nükleer antijeni
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü ( <i>Platelet-derived growth factor</i> )

PI	İzoelektrik nokta
PI3K/ Akt	Fosfatidilinositol 3
PIGF	Plasenta Büyüme Faktörü ( <i>Placental Growth Factor</i> )
pNA	p-nitroanilitin
PS	Fosfatidilserin ( <i>Phosphatidyl serine</i> )
PUMA	P53-up regulated modülatör of apoptosis
ROT	Reaktif oksijen türleri ( <i>Reactive oxygen species</i> )
RTK	Reseptör tirozin kinaz
Smac/DIABLO	İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü/Doğrudan AIP'e bağlanan düşük pI'lı protein
SOD	Süperoksit dismutaz
SU 1498	[(E)-3-(3,5-Diizopropil-4-hidroksifenil)-2-[(3-fenil-n-propil) aminokarbonil] akrilonitril]
TGF- $\alpha$	Transforme edici büyüme faktörü alfa
TGF- $\beta$ 1	Transforme edici büyüme faktörü beta bir ( <i>Transforming growth factor-beta bir</i> )
Tie	Tirozin kinaz ile immün globülin benzeri ve EGF-benzeri domainler.
Tie-1	Reseptör kinaz-1
Tie-2	Reseptör kinaz-2
TK	Tirozin kinaz
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör alfa ( <i>Tumour necrosis factor alpha</i> )
TRADD	TNF reseptörü ile ilişkili ölüm bölgesi ( <i>TNF receptor associated death domain</i> )
TRAIL	TNF ilişkili apoptozis uyarıcı ligand ( <i>TNF related apoptosis-inducing ligand</i> )
TSP-1	Trombospondin-1
VE-(kaderin)	Vasküler endotelyal kaderin
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
VEGF-A	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-A
VEGF-B	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-B

VEGF-C	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-C
VEGF-D	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-D
VEGF-E	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-E
VEGFR-1/Flt-1	VEGF reseptör-1
VEGFR-2/Flk-KDR	VEGF reseptör-2
VEGFR-3/Flt-4	VEGF reseptör-3
VPF	Vasküler permeabilite faktörü
XBP	X-box bağlı protein
XOD	Ksantin oksidaz



## ÖZET

### Karaciğer Sirozu Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda VEGF reseptör-2 İnhibitörü SU 1498' in Anjiyogenez ve Apoptozis Üzerine Etkisi

Karaciğer sirozu diffüz fibroz, skar doku ve regeneratif nodüller ile karakterize yaygın bir karaciğer hastalığıdır. VEGF başlıca proanjiyogenik mediyatörlerden birisidir. Bu çalışmada, karsinojen bir ajan olarak bilinen N-nitrozodietilamin ile deneysel karaciğer sirozu oluşturuldu. Bu çalışmada; VEGFR-2 inhibitörü; SU 1498' in anjiyogenez ve apoptozis üzerine etkisinin karaciğer sirozunda araştırılması amaçlanmıştır. Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), Siroz sonrasında+SU 1498 (I) (300µg/kg/hafta) olmak üzere 6 grup oluşturuldu. Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) gruplarındaki sıçanlar; siroz grubundan rastgele seçilen sıçanlarda histopatolojik olarak siroz oluşumu saptandıktan sonra öldürülmüşlerdir. Siroz sonrasında+SU 1498 (I) (300µg/kg/hafta) grubundaki sıçanlara ise 8 hafta SU 1498 uygulaması yapıldıktan sonra bu gruptaki sıçanlar da öldürüldü. Karaciğer sirozunda anjiyogenez belirteci olarak VEGFR-2 gen ekspresyonu ve apoptozis yol izi belirteci olarak kaspaz -3, -8 ve -9 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Antioksidan kapasitenin araştırılması için ise redükte glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyonunu araştırmak amacı ile malondialdehit (MDA) düzeyleri kolorimetrik yöntemlerle belirlendi. VEGFR-2, kaspaz -3, -8 ve -9 gen ekspresyonunda ve GSH düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken; lipid peroksidasyonunda tüm gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış bulunmuştur. Ancak ilginç olarak histopatolojik incelemeler sonucunda Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta) grubunda siroz oluşumunun engellendiği gözlenmiştir. Sonuç olarak SU 1498 karaciğer sirozunda antifibrogenik bir ajan olarak kabul edilebilir ve mekanizmanın tam olarak aydınlatılması için karaciğere daha spesifik hücrelerde farklı doz ve zaman aralıklarında çalışmalar sürdürülebilir.

**Anahtar kelimeler:** Karaciğer sirozu, anjiyogenez, apoptozis, kaspaz, SU-1498, VEGFR-2

## ABSTRACT

### Effect of VEGFR-2 Inhibitor, SU-1498 on Angiogenesis and Apoptosis in Model of Liver Cirrhosis in Rats

Cirrhosis is a common and consequence of chronic liver disease that characterized by the diffuse fibrosis, scar tissue and regenerative nodules. VEGF is one of the major proangiogenic mediators which takes part in the development of liver cirrhosis. In this study, experimental liver cirrhosis had been developed by N-nitrosodietilamin which known as a carcinogenic agent. In this study, we aimed to determine the effect of the VEGFR-2 inhibitor, SU 1498 on angiogenesis and apoptosis in liver cirrhosis. 6 groups were included as Control, Cirrhosis, DMSO, Cirrhosis+SU 1498 (I) (250µg/kg/week), Cirrhosis+SU 1498 (II) (500µg/kg/week), After Cirrhosis+SU 1498 (I) (300µg/kg/week). Control, Cirrhosis, DMSO, Cirrhosis+SU 1498 (I) (250µg/kg/week) and Cirrhosis+SU 1498 (II) (500µg/kg/week), groups were killed when cirrhosis was established by evaluation of histopathological investigations in rats which were chosen randomly from the Cirrhosis group. After cirrhosis was established SU 1498 was administered for 8 weeks to rats After Cirrhosis+ SU 1498 (300µg/kg/week) group. Angiogenesis was evaluated by measurement of VEGFR-2 gene expression and apoptosis was evaluated by caspase -3, -8 and -9 gene expression by RT-PCR. Antioxidant capacity was evaluated by measurement levels of reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation was evaluated by malondialdehyde (MDA) by colorimetric methods. Histopathological investigations were also carried out. VEGFR-2 levels, caspase -3, -8 and -9 enzyme activities and GSH levels did not point out any statistically difference and also increased lipid peroxidation was observed in all groups compared with control. But surprisingly histopathological findings indicated that cirrhosis development was significantly reduced by SU 1498 (250µg/kg/week) (I). In conclusion; SU 1498 may be considered as a promising antifibrotic agent in liver cirrhosis and the mechanism should be investigated in more special cells, different doses and intervals.

**Key Words:** Liver cirrhosis, angiogenesis, apoptosis, SU 1498, VEGFR-2, caspase

# 1. GİRİŞ

Karaciğer sirozu kronik karaciğer hasarının bir sonucu olup, viral hepatit, alkol ve kriptojenik nedenler gibi çeşitli etmenlerin sebep olduğu, nodül oluşumu ile sonuçlanan, kronik ve diffüz bir hastalıktır (1-4). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de karaciğer sirozu milyarlarca hastayı etkilemektedir. Batı ülkelerinde karaciğer sirozunun en önemli sebebi olarak alkol gösterilirken, ülkemizde kronik viral hepatitler karaciğer sirozu nedeninde ön plana çıkmaktadır (5, 6).

Anjiyogenez; dinamik, hipoksi uyarımlı ve büyüme faktörlerine bağlı, mevcut kan damarlarından yeni damar oluşumudur (7). Anjiyogenez birçok fizyolojik olayda rol alabileceği gibi, patolojik durum varlığında da kontrolsüz anjiyogenez olarak tanımlanır ve birçok hastalığın yanı sıra özellikle tümör büyümesi ve metastazından sorumlu tutulur (8, 9). Anjiyogenez proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge ile kontrol altında tutulmaktadır (10, 11). Anjiyogenezin oluşumu endotelial hücrelerin diferansasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile gerçekleşir (9).

1971 yılında Judah Folkman' ın araştırmaları ile anjiyogenez faktörlerine yönelik çalışmalar başlamıştır. Judah Folkman, anjiyogenez inhibisyonunun kanser tedavisinde ümit verici olabileceğini bildirmiştir (10). Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperailisinin üyesi olan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) fizyolojik ve patolojik anjiyogenezin en önemli büyüme faktörüdür (10, 12). VEGF fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde önemli bir rol üstlenmesinin yanı sıra, antiapoptotik proteinler olarak bilinen Bcl-2' yi de indüklemektedir. Son yıllarda büyük damar endotelial hücrelerinin apoptozisinin, VEGF tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu da VEGF' in endotelial hücre proliferasyonunu apoptozisi inhibe ederek de desteklediğini göstermektedir (13).

Apoptozis fizyolojik ve kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanır. Çok hücreli canlılarda, gelişim sırasında görülebileceği gibi gelişimi tamamlanmış organizmaların homeostazında da görülebilir. Apoptozis tipik morfolojik özelliklere sahiptir ve birçok sinyal ve protein tarafından kontrol edilmektedir (14-16). Karaciğerde apoptozis, karaciğer hasarına karşı oluşan hücresel bir cevaptır ve bu cevap sitokin kaskadların

başlamasına neden olur (17). Apoptozisin bugüne kadar birçok yolağından bahsedilmiştir ancak ölüm reseptörleri aracılı ekstresek ve mitokondri aracılı intrensek yol izleri olmak üzere iki temel yol izi bulunmaktadır (18).

SU 1498; VEGFR-2' in spesifik inhibitörüdür. VEGFR-2, fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde VEGF için yüksek afinite gösteren bir tirozin kinaz reseptördür. Son yıllarda kanser ve diğer birçok hastalığın tedavisi için VEGFR' ünü inhibe eden ilaçlar üzerinde durulmaktadır ve bu ümit verici ilaçlardan biri de SU 1498' dir (19, 20).

Bu çalışmada, primer karaciğer tümörlerine neden olan nitrozaminler arasındaki en önemli çevresel karsinojenlerden biri olan N-nitrosoethylamine (DEN) ile deneysel olarak oluşturulan karaciğer sirozu modelinde, VEGFR-2 inhibitörü SU 1498' in anjiyogenez ve apoptozis mekanizması üzerine etkisini araştırmayı amaçladık. Sırasıyla Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) olmak üzere 6 farklı grup oluşturuldu. Çalışmamızda hem karaciğer sirozu oluşum sürecinde hem de karaciğer sirozu oluştuktan sonra uygulanan VEGFR-2 inhibitörü SU 1498' in, anjiyogenez ve apoptozis üzerine etkisini araştırmayı planladık. Bu çalışmada anjiyogenez göstergesi olarak VEGFR-2 gen ekspresyonu ve apoptozis mekanizmasının göstergesi olarak kaspaz -3, 8, 9 enzim aktiviteleri ve ayrıca oksidatif stresin karaciğer sirozunda arttığını gösteren bilgiler doğrultusunda antioksidan sistemde yer alan glutatyon (GSH) miktarı ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak da malondialdehit (MDA) düzeylerini saptamayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karaciğer Sirozu

Karaciğer sirozu viral hepatit, alkol ve çeşitli etmenlerin neden olduğu, fibroz ve nodüler rejenerasyona yol açan parankimal hasar ile karakterize, vasküler yapının bozulması ile ilişkili, dönüşümü olmayan kronik ve diffüz bir hastalıktır (1, 2, 21). Siroz nodül oluşumu ile sonuçlanan, hepatik parankimada oluşan fibrozun bitiş safhasıdır. Siroz ve fibroz viral, otoimmün, alkol sebepli, kolestatik ve metabolik hastalıklar gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanan kronik karaciğer hasarının sonuçlarıdır (3, 4). Fibrozun ve özellikle de sirozun gelişimi önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Sirozun ve hepatik fibrozun sebepleri çoklu olmakla birlikte; genetik, metabolik, inflamatuvar ve toksik karaciğer hastalıkları olabilir. Bütün bu durumlarda, hepatik yaranın kompozisyonu benzerdir (3, 4). Siroz, dünyada yüz milyonlarca hastayı etkilemektedir. Amerika’ da siroz en yaygın non-neoplastik ölüm sebebidir. Bununla birlikte çoğunlukla sirotik karaciğerde meydana gelen karaciğer kanseri nedeni 10.000 lerce ölümden, hepatik kanserli ölüm oranı istikrarlı bir şekilde artmaktadır (6). Batı ülkelerinde karaciğer sirozunun en önemli sebebi olarak alkol gösterilmektedir. Ülkemizde ise karaciğer sirozunun başlıca nedeni kronik viral hepatitlerdir (5).

Siroz sözcüğü “ scirrhus” kelimesinden türetilmiştir ve eski yunancada turuncu renk anlamındadır. Literatüre ingilizcede “cirrhosis” olarak geçmiştir, dilimizde ise siroz olarak tanımlanır. Siroz terimini Laennec, sirozlu bir hastanın karaciğerinin portakal rengi görünümündeki morfolojisinden esinlenerek tanımlanmıştır (22).

Karaciğer sirozlu hastalarda hepatoselüler karsinoma (HCC) riski artmaktadır. Mevcut kanıtlar sirozun HCC ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Tümör riskinin artışı etiyolojiye ve sirotik sürece bağlı olabilir (2, 23). Dünyanın bazı yerlerinde neoplastik ölüm sebebi olarak da bilinen ve karaciğerin en sık görülen malign tümörlerinden biri olan HCC, erkeklerde 5. kadınlarda 8. dünyada ise 5. en sık görülen kanser olup kanserle ilgili ölümlerde 3. sırayı almaktadır. HCC, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde Hepatit C ile ilişkili, Asya ve Afrika kıtalarında ise Hepatit B

virüsü ile daha çok ilişkilidir. Hepatit B virüsü taşıyan erkekler HCC oluşumu için en yüksek risk altında olan gruptur (24-26).

### 2.1.1. Karaciğer Sirozu Etiyolojisi

Karaciğer sirozunun çeşitli nedenleri vardır. Kronik hepatitler, alkole bağlı siroz, HBV, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomunun başlıca nedenlerindedir. Bunların dışında metabolik, biliyer ve kriptojenik sebepler de siroz oluşumuna neden olmaktadır (Çizelge 2.1) (1, 2, 10, 22, 23).

**Çizelge 2.1.** Karaciğer Sirozu Etiyolojisi

- 
1. Viral hepatit (B, C, Delta)
  2. Alkol
  3. Biliyer tıkanıklık
    - Primer
    - Sekonder
  4. Venöz akım tıkanıklığı
  5. Otoimmün hepatit
  6. Toksin ve ilaçlar
  7. Metabolik nedenler
    - Wilson hastalığı
    - Hemokromatozis
    - Alfa-1 antitripsin eksikliği
    - Tip-IV Glikojenez
    - Galaktozemi
    - Hereditör tirozinemi
    - Kistik fibrozis
  8. Hindistan çocukluk çağı sirozu
  9. Diğer nedenler
  10. Kriptojenik\*  
(\*Bilinen nedenlerden hiçbirinin görülmediği siroz). (1, 22).

Karaciğer sirozu oluşumu süreci hastalığın nedenine ve hastanın kişisel özelliklerine göre büyük farklılıklar gösterir. Örneğin Hepatit C sonrası siroz gelişimi 15-30 yıl sürerken Hepatit B sonrası siroz gelişimi 1-2 yıl gibi kısa bir sürede tamamlanabilir (22, 27). Milyonlarca insan her yıl HBV ile ilgili kronik karaciğer hastalıklarından hayatını kaybetmektedir. Hepatit C virüsü ise gelişmiş ülkelerde karaciğer sirozunun %40 'ından sorumlu tutulmaktadır (5). Ülkemizde ise ortalama olarak alkol nedenli siroz sıklığı %10, viral hepatitlerin sebep olduğu siroz sıklığı ise %60' a varan orandadır ( Çizelge 2.2) (1, 5, 22).

**Çizelge 2.2.** Karaciğer Sirozunun Ülkemizdeki Etiyoloji Oranları (22).

Viral Hepatitler (B, C, Delta)	% 60
Alkol	% 11
Alkol + Viral Hepatit	% 4
Diğer Nedenler	% 9
Kriptojenik	% 16

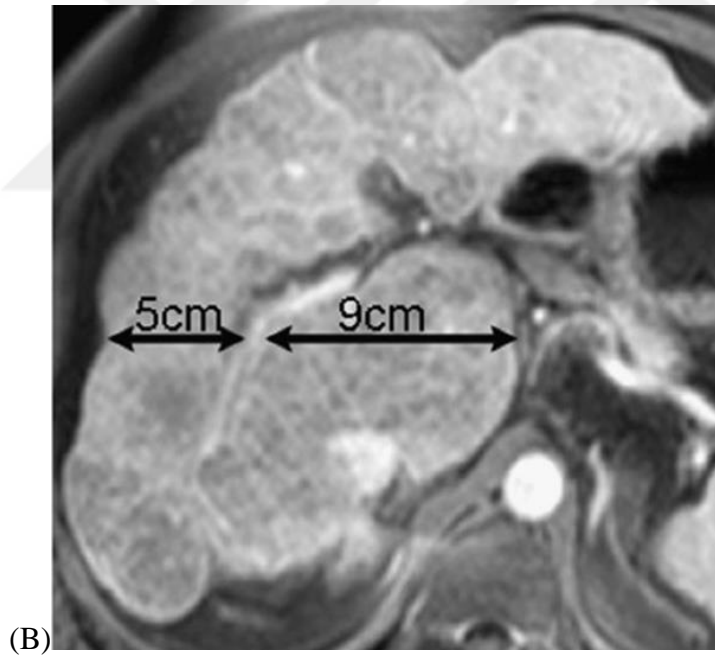
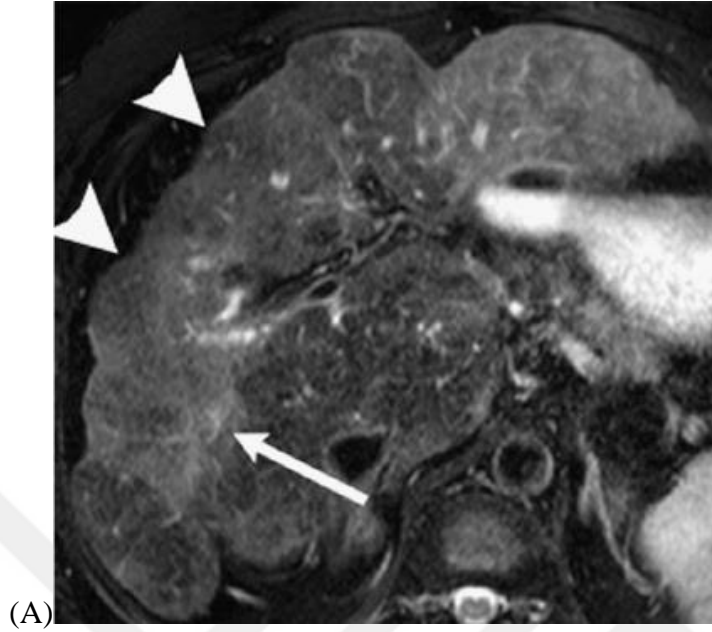
### **2.1.2.Karaciğer Sirozu Morfolojisi**

Karaciğer sirozunda morfolojik ayırım üç şekilde yapılır:

1. Makronodüler siroz: Çapı 3 mm' den büyük nodüller bulunur. Bu nodüller bazen birkaç cm' yi bulabilir. Büyük nodüller içinde sağlam lobüller bulunabilir.
2. Mikronodüler siroz: Çapı 3 mm' den küçük nodüller içerir. Kalın, düzenli septa oluşumu ile karakterizedir. Mikronodüler siroz kategorisine alkol, biliyer tıkanıklık ve hemokromatozis nedenli siroz ile Hindistan çocukluk çağı sirozu örnek olarak verilebilir.
3. Karışık (Miks) nodüllü siroz: Makro ve mikro nodüllerin aşağı yukarı eşit miktarda görüldüğü siroz morfolojisidir (1, 21, 23).

Karaciğer sirozunun etiyolojisi ne olursa olsun sonunda ortaya çıkacak morfolojik tablo değişmez (1, 21). Sirozun erken evresinde karaciğer normal

görünebilir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte, karaciğer parankimasının heterojenitesi ve yüzey nodülleri gözlemlenmektedir (Şekil 2.1 ) (2).



**Şekil 2.1.** İlerlemiş karaciğer sirozunda nodül oluşumu. Tipik karaciğer sirozu morfolojisinde MR görüntüsü (2).

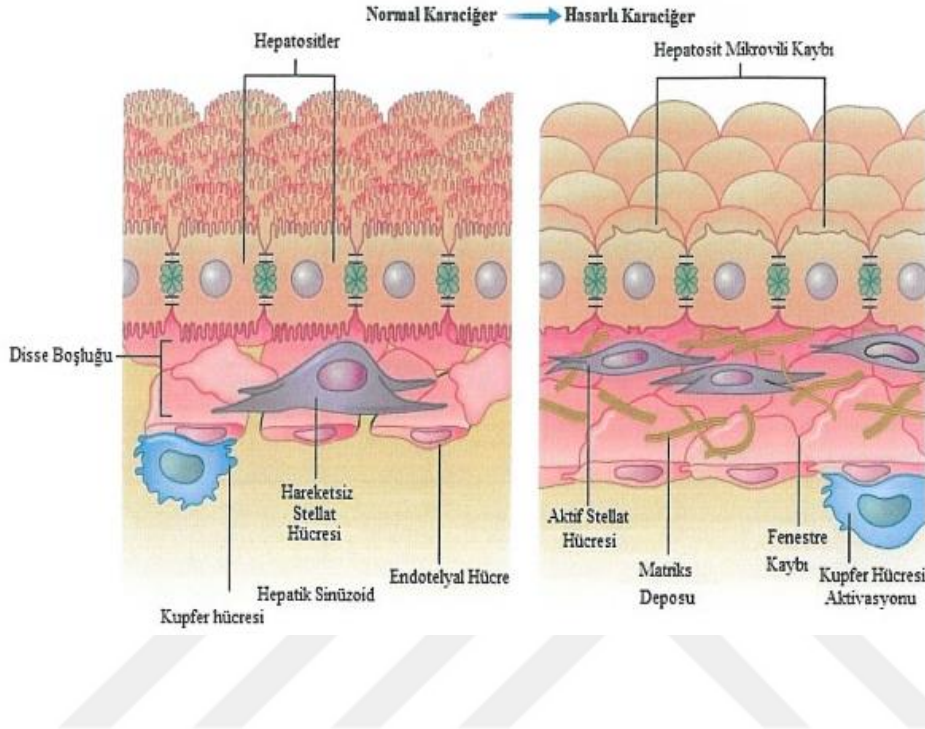
Şekil 2.1' de görülen kaudat lob hipertrofisi karaciğer sirozu morfolojisinde en karakteristik özelliktir. Şekil 2.1 (A), MR görüntüsünde tipik sirotik morfolojidir. Oklar hafif loblu karaciğer kenarlarını ve düzensiz fibrozun neden olduğu hepatik parankimanın zayıflatılmış bölgelerini göstermektedir. Şekil 2.1 (B) ise, homojen

olmayan karaciğer büyümesini ve sağ lob oranının daha büyük olduğunu ve karaciğer homojenitesinin bozulduğunu göstermektedir (2).

### **2.1.3. Karaciğer Sirozu Patogenezi ve Fibroz**

Kronik hepatit en az 6 ay onarımı gerçekleşmeyen karaciğer inflamasyonu olarak tanımlanmaktadır (10, 23). Karaciğer hasarı akut hepatitten HCC' ye; apoptozis, nekrozis, inflamasyon, immün yanıt, fibroz, iskemi ve rejenerasyon yollarını sırayla izleyerek ulaşır (25, 26). Siroz, hepatoselüler nekrozun başlattığı fibroz ve nodül formasyonu ile birlikte oluşan diffüz bir olaydır. Siroz oluşumu için nekrozun aylarca ve yıllarca oluşumu şarttır. Sirozun bazı tanımları kriter olarak nekrozun varlığının gerekliliğini savunur. Bu nedenden dolayı; nekroz sirozun morfolojik tanımına dahil edilir (1, 22, 23). Fibroz ise kendi başına bir hastalık olmaktan ziyade çeşitli karaciğer hasarlarının bir parçası olarak tanımlanabilir (23). Hepatik fibroz, ekstraselüler matriks (ECM) birikimi veya akut ya da kronik karaciğer hasarının cevabıdır ve sirozla sonuçlanır (3). Fibrozu anlayabilmek için ECM' nin yapısını bilmek gerekir. ECM, normal ve fibrotik karaciğerin yapısını oluşturan makromoleküllerin dizilimini kapsar. Bu makromoleküller yapısal ve destekleyici moleküller içeren 3 temel aileden oluşur; kolajenler, glikoproteinler ve proteoglikanlar. Kolajen ailesi karaciğerde hızlı bir şekilde çoğalmıştır ve anjiostatin molekülünün başı çektiği XVIII kolajen bulunur. Glikoproteinler fibronektin, laminin, merosin, tenaskin, nidojen ve hiyaluronik asit içerir. Proteoglikanlar heparan, dermatan sülfat, kondrotin sülfat, perlekan, sindekan, biglikan ve dekorin içerir. Bu moleküller arasında, farklı izoformları ve farklı doku bölgelerindeki değişken kombinasyonları ile birlikte mükemmel bir heterojenite vardır (3, 4). Sirozik karaciğerde normal karaciğere göre ECM yaklaşık 6 kat daha fazladır ve erken hasarda kolajen (tip III ve V) ve fibronektin birikimi görülür. Kronik hasarda ise kolajen (tip I ve IV), undulin, elastin ve laminin birikiminin arttığı görülür (4, 28, 29). Normal karaciğerde, Disse' nin subendotelyal boşluğu, epitelyumu sinüzoidal endotelyumdan ayırır. Disse boşluğu tipik matriks membrana benzemeyen bir membran içerir. Normal matriks membran proteoglikanlardan, glikoproteinlerden ve non-fibril kolajenlerden (tip IV, VI, XIV) meydana gelir. Karaciğerin fibrotik olmasıyla birlikte subendotelyal boşluktaki (Disse) ECM komponentleri ve kolajen (tip I ve III) miktarı

artar (30). Bu kapillarizasyon, hepatosit mikrovillerin ve endotelial fenestrasyonların kaybına neden olur (Şekil 2.2) (3).



Şekil 2.2. Normal ve hasarlı karaciğerde hepatik karaciğer hücreleri ve hepatik sinüzoid (3).

Normal karaciğerde, stellat (yıldız) hücreler ECM' in selüler kaynağı olarak özdeşleşmiştir. Bu belirgin hücre popülasyonu subendotelialdeki Disse boşluğunda hepatositler ve sinüzoidal endotelium arasına yerleşir (Şekil 2.2) ve nonparankimal popülasyonun üçte birinin yerine geçer veya tüm hücre miktarının %15 ini oluşturur. Normal karaciğerde stellat hücrelerin görevi A vitaminini retinil ester şeklinde depolamaktır (10, 31). Stellat hücrelerin aktivasyonu karaciğer hasarında anahtar bir olaydır ve bu aktivasyon stellat hücreleri A vitamini depolayan hücrelerden, fibrojenik hücrelere dönüştürür. Aktivasyon olayı başlama (preinflamasyon) ve devam safhası olmak üzere iki safhada gerçekleşir (4, 32, 33).

Stellat hücrelerinin bu yeni formuna "miyofibroblast" adı verilir. Miyofibroblastlar, ECM in proteinlerinin sentezinden, büyüme faktörleri ve sitokinlerin sentezinden sorumludur. Stellat hücreler en fazla hasarlı olan bölgelerde çoğalırlar ve daha sonra ECM birikir (4, 22).

Karaciğer sirozunda bağ dokusu birikimi olarak ifade edebileceğimiz fibroz, ECM birikimi ile karaciğerin normal yapısı ve mikrovasküler ilişkilerini bozar. Bu süreç sonunda karaciğer sirozu gelişir. Karaciğer sirozunda fibroz, fibrogenez ile fibroliz arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur (1, 22, 23, 34). Fibrogenez, stellat hücrelerin hepatik fibroza olan etkisinin anahtar elemanı olarak değerlendirilebilir. Transforme edici büyüme faktörü beta1 (TGF- $\beta$ 1) ise en güçlü fibrogenik faktördür. Budan dolayı TGF- $\beta$ 1 regülasyonu önemli bir uyarıcı olarak kabul edilir. Birçok çalışma karaciğer hasarı boyunca stellat hücrelerin TGF- $\beta$ 1 eksprese ettiklerini bildirmektedir (3, 35).

#### **2.1.4. Karaciğer Sirozunda Klinik ve Tanı**

Son 20 yıllık deneysel çalışmalar; fibrotik ve normal karaciğer yapısındaki ekstraselüler matriks yapı ve kompozisyonu, çeşitli matriks bileşenlerinin selüller kökenleri, fibrogenez ve fibroliz, fibrogenik reaksiyonlara zemin hazırlayan genetik koşullar ve birçok deneysel tedavi yaklaşımları ile ilgili detaylı bilgi sağlamıştır (26). Karaciğer sirozu klinikte rastlantısal olarak tanımlanabileceği gibi asit, sarılık veya varis kanaması gibi bulgularla da tanımlanabilir. Bazen de tanı sadece bir otopsi bulgusu olabilir. Asit, sarılık, varis kanaması, hepatik ensefalopati gibi durumlar tanının geç konulduğu ve ciddi prognozunu olduğu anlamına gelir. Hastalığın tanısının erken konulabilmesi hastanın kültürel ve sosyoekonomik durumuna da bağlı olabilir (1, 21).

**Kompanse siroz:** Kompanse sirozlu hastalarda tanı laboratuvar incelemeleri sırasında konulabilir. Biyokimyasal değerler de Gama Glutamat Transferaz (GGT) ve transaminaz düzeylerinde hafif artış görülebileceği gibi normal değerler de görülebilir. Kompanse sirozlu hastalar uzun yıllardan sonra dekompanse döneme girebilirler (1, 21, 27).

**Dekompanse siroz:** Dekompanse sirozlu hastalarda asit, varis kanaması, hepatik ensefalopati görülür ve bu nedenlerle hekime başvururlar. Kilo kaybı, halsizlik, yorgunluk, hafif ateş, adele erimesi gibi şikâyetler görülür. Bu şikâyetlerin olması hepatosit nekrozunun veya HCC' nin ilerliyor olmasına işaret edebilir. 1-2 cm nodül tespit edilen sirotik karaciğerde kesin tanı için en az iki tane dinamik görüntüleme (tomografi, MRI) yöntemleri ile araştırmaya gidilmelidir. Ekstraselüler matriksin daha

iyi anlaşılmasıyla karaciğer sirozu için yeni tedavi yöntemlerinin bulunabileceği düşünülmektedir (21, 22, 25, 27).

## **2.2. Anjiyogenez**

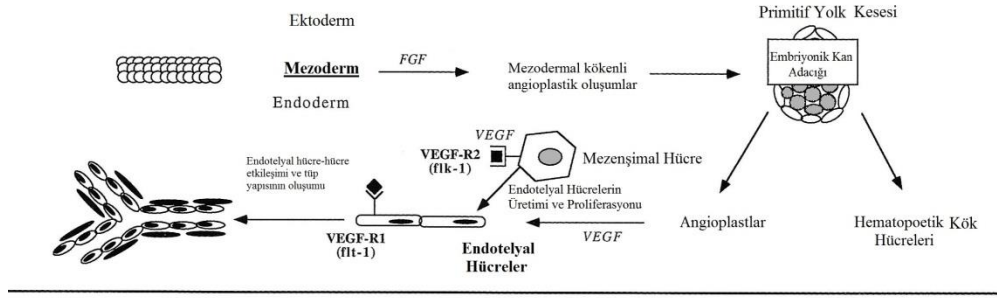
### **2.2.1. Anjiyogenez Kavramı**

Memeli hücreleri yaşamlarını devam ettirebilmek için oksijen ve besine ihtiyaç duyarlar ve bu nedenle 100 µm' den 200 µm' lik boyuta kadar kan damarlarıyla donatılmışlardır. Çok hücreli organizmalar bu ölçüleri arttırmak için vaskülogenez ve anjiyogenez yoluyla yeni kan damarları oluşturmak zorundadırlar (36). Omurgalı embriyolarda fonksiyonel olarak ilk gelişen organ kardiyovasküler sistemdir (10). Vasküler sistem gastrulasyon evresinden kısa bir süre sonra gelişir. Embriyonik vaskülarite sisteminin oluşumu, progenitör hücrelerinden (hemangioblastlar) kan adacıklarının görülmesiyle başlar. Kan adacıklarının oluşumu ile hemangioblastlar, endotelial hücrelere ve hematopoetik hücrelere farklılaşırlar (Şekil 2.3). Kan damarları oluşumunun ilk fazı vaskülogenez olarak bilinir ve embriyogenez boyunca vasküler sistemin ilk adımıdır. Bilinen ikinci faz ise anjiyogenezdir (37, 38). Endotelial progenitör hücrelerinin endotelial hücrelere farklılaşmasıyla kan vasküler sisteminin ortaya çıkması olan vaskülogenez, embriyogenezin erken evresidir. Kan ve lenfatik vasküler sistemler, hücrelere oksijen ve besin sağlamak için bütün organ ve dokulara nüfus ederler. Lenfanjiyogenez ise, yeni lenfatik damar oluşumudur. Lenfatik damarlar tümör yayılımının başlangıcında rota oluşturmaktadır (37, 39).

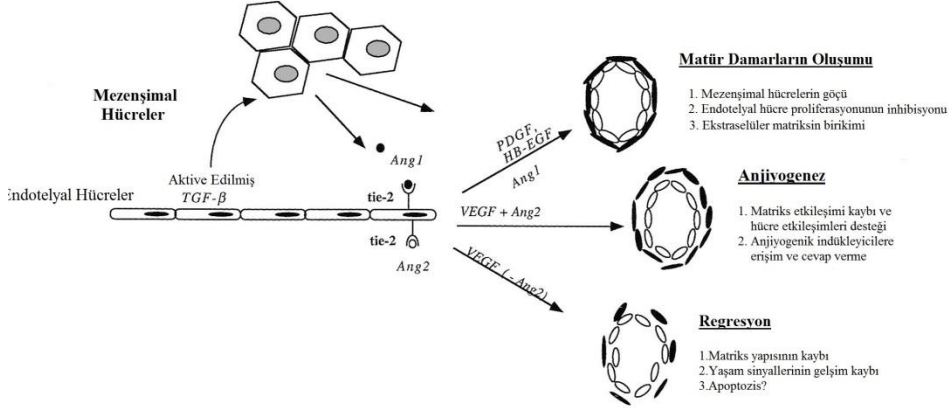
Anjiyogenez dinamik, hipoksi uyarımlı ve büyüme faktörlerine bağlı (7) mevcut kan damarlarından yeni kapiller damar gelişimi olup, yara iyileşmesi, organ hipertrofisi ve embriyonik gelişme gibi fizyolojik olaylar döneminde görülebileceği gibi; patolojik durum varlığında kontrolsüz anjiyogenez olarak adlandırılır ve diyabetik retinopati, kronik enflamasyon, ateroskleroz, tümör büyümesi ve metastazından sorumlu tutulur (8, 9). Anjiyogenez, genelde yara iyileşmesinde ve tümör metastazında, embriyonun avasküler bölgelerinde meydana gelen ve matür hayvanlarda defalarca tekrarlanan yeni kan damarları oluşumuyla vasküler ağacın yayılmasıdır (40).

Anjiyogenezin tümör çevresinde meydana geldiği fikri yaklaşık 100 yıl önce ortaya atılmıştır. Tümör yayılımının anjiyogenez ile meydana geldiği 1968 yılında ileri sürülmüştür. 1971' de Judah Folkman tümör metastazının ve gelişiminin anjiyogenez bağımlı olduğunu ve anjiyogenezini bloke etmenin tümör gelişimini durdurmak için bir strateji olabileceğini öne sürmüştür. Bu olasılık proanjiyogenik ve antianjiyogenik moleküllerin araştırılmasına teşvik olmuştur. 1976' da Gullino, kanserli dokuların gelişimi için anjiyogenezin gerekliliğini göstermiştir. Gullino bu hipoteziyle kanseri engellemek için stratejiler hedeflemiş ve bu fikir genetik yaklaşımlar tarafından teyit edilmiştir (36). "Anjiyogenik şalter" olarak bilinen anjiyogenezin başlaması, tümör gelişimi için kritik bir basamaktır (39) ve günümüzde antianjiyogenik faktörlerin baskın olması durumunda anjiyogenik şalterin "off" olduğu, denge anjiyogenez lehine olduğunda ise anjiyogenik şalterin "on" olduğu kabul edilmiştir (41).

Yeni damarların formasyonu, gelişimi ve matürasyonu oldukça çok sayıda reseptörün ve pek çok ligandın zincirleme aktivasyonunu gerektiren, çoklu stimüle ve inhibe edici sinyaller arasındaki ince dengeyi gerektiren oldukça kompleks bir mekanizmadır (37). Bu mekanizma proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler arasındaki denge tarafından regüle edilir ve bu denge sıkı bir kontrol altındadır (36). Bu sistemin dikkatli regülasyonu ve faal olan dengesi organizmalar için önemlidir çünkü kan damarlarının fazla veya eksik gelişimi, tümör oluşumu da dahil olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır (37, 39). Anjiyogenik dallanma olayında endotelial başlatıcı hücreler, anjiyogenik faktörler ve onların reseptörleri arasındaki ilişki rol oynadığı gibi, vaskülogenez ile lenfanjiyogenez arasındaki etkileşim de rol oynamaktadır. Anjiyogenik sinyal stimülasyonunda hipoksi, düşük PH ve besin yoksunluğu gibi hücrel stres faktörleri önemlidir. Anjiyogenez daha olgun damarların geliştiği yeni kapillerdeki endotelial hücrelerin migrasyonu, proliferasyonu ve differansasyonu ile sonuçlanan moleküler ve hücrel olaylar serisinin bir sonucudur (Şekil 2.3). Anjiyogenik kaskad, aktivasyon ve cevap fazını birlikte içermektedir (42).



### Anjivogenez



Şekil 2.3. Vaskülojeniz ve anjiyogenezde yeni damar formasyonu (40).

Anjiyogenez, var olan kan damarı duvarının lokal yıkımı ve endotelial hücrelerin migrasyonu ve proliferasyonu ile başlar. Endotelial hücreler, oluşturulmuş kan damarı duvarları etrafındaki tübuler yapıda toplanırlar. Damarlar, endotelial hücreler ve duvar hücreleri olmak üzere iki temel hücre tipinden oluşur. Bu yapıların birbirleriyle olan etkileşimlerini anlamak için anjiyogenez mekanizmasını anlamak önemlidir (37).

### 2.2.2. Anjiyogenez Mekanizması

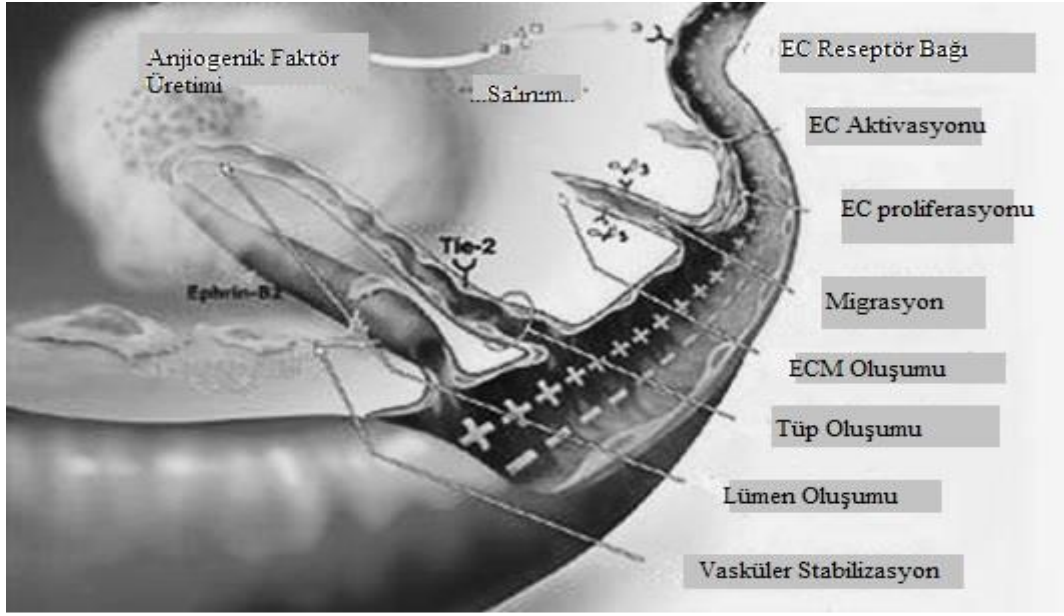
Anjiyogenez, endotelial hücrelerin differansasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile gerçekleşen kompleks bir süreçtir (9). Bu kompleks süreç bir dizi basamak halinde gözlemlenir (39, 41);

1. Damar duvarındaki perisitlerin vasküler destabilizasyon için ayrılması,
2. Endotelial proteazlar tarafından ekstraselüler matrisin bozulması,
3. Endotelial hücrelerin migrasyonu,
4. Endotelial hücrelerin proliferasyonu,

5. Endotelyal hücreler tarafından tüp formasyonu oluşumu,
6. Perisitlerin vasküler stabilizasyon için yeniden yerleşimi ve matürasyon.

Endotelyal hücreler büyümeyi stimüle ettiklerinde damar etrafındaki bazal membranı parçalamak için proteaz ve diğer sindirim enzimlerini salgırlar. ECM' deki bu parçalanma, matriksteki proanjyogenik faktörlerin salınmasına izin verir (42). Anjiogenik faktörler, endotel hücrelerindeki reseptörlerine bağlanır, onları aktive eder ve endotelyal hücrelerin ECM içine migrasyonu gerçekleşir. ECM içerisine migrasyonu gerçekleşen endotelyal hücrelerinin proliferasyonu sağlandıktan sonra anjiogenik uyarıyla birlikte yer değiştiren endotel hücreler tüp şeklinde dizilerek lümen oluştururlar (10, 43). Endotelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonu ile hematopoetik progenitör hücrelerinin de kapiller lümen oluşumunda yer aldığı düşünülmektedir (42). Yeni oluşumun matürasyonu ve stabilizasyonu ile anjiyogenez tamamlanmış olur (10, 43). (Şekil 2.4). Yeni oluşan mikrovaskülerin stabilizasyonu ve matürasyonu, yeniden bazal membran oluşumu, perisitlerle kuşatılmış damarlar ve kompleks formasyon ile sonuçlanır (42). Bu sıralama, gelişmekte olan bir embriyodaki fizyolojik anjiyogenezin morfolojik basamaklarına veya bir yara iyileşmesinde meydana gelen anjiyogeneze benzerlik göstermektedir (44). Tümör vasküler ağı gibi patolojik anjiyogeneze ise sonuç fazı düzensiz mikrodamarlarla, kısmi endotelyal konuçlanması, parça parça bazal membran oluşumu ve yüksek mikrovasküler permeabilite ile sonuçlanır (42).

Anjiyogenezin bu karmaşık mekanizmasında, ECM' den ve ECM' yi çevreleyen hücrelerden sentezlenen birçok büyüme faktörü, sitokinler ve bunların reseptörleri önemli rol oynayan maddelerdir (45). Anjiyogenezin bu ardışık basamaklarında VEGF, anjiopoetin-1 (Ang-1), anjiopoetin -2 (Ang-2), PDGF ve TGF- $\beta$  regülasyonda önemli rol alır (39). Fare embriyolarında deneysel vaskülogenez ve anjiyogenezin moleküler ve hücresel mekanizmasının düzenlenmesinde VEGF ve fibroblast büyüme faktörlerinin (FGF), vasküler gelişimin başlaması için elzem olduğu iddia edilmektedir (11).



Şekil 2.4. Anjiyogenezin Evrelerinin Gösterimi (43).

Hipoksi bilinen en önemli anjiyogenez başlatıcılarından biridir ve çeşitli hücre tiplerinde VEGF ekspresyonunu indükler. Hipoksi aynı zamanda endotelial hücrelerde dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde Ang-2' yi indükler. Ang-2, Tie-2' nin antagonistik ligandır ve vasküler duvardan perisitlerin ayrılmasını sağlar. Zincirleme bir şekilde VEGF, ECM degradasyonunu sağlamak için stabilizasyonu bozulan bu damarlardan proteazlar aracılığıyla yeni damar oluşumunu sağlamak amacıyla endotelial hücreleri stimüle ederek endotelial hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu sağlar. Ang-2 anjiyogenezini stimüle etmez ancak VEGF ile bağlandığında VEGF' in anjiyogenik aktivitesini artırır. Yeni damarların endotelial hücreleri, yeni damarlardaki perisitleri etkileyen PDGF' yi salgılatır. Ang-1 perisitlerden sentezlendiğinde, Ang-2' yi baskılar, perisitler yeni damarları stabilize eder. Ek olarak Ang-1, direk olarak endotelial hücrelerin migrasyonunu stimüle eder. Bu süreç sonunda, TGF- $\beta$  aktive edilir ve TGF- $\beta$  yeni damarların matürasyonunu sağlar (39).

Vasküler duvarın oluşumu ve büyümesi, reseptör tirozin kinaz ailesinden olan tirozin kinaz ile immün globülin benzeri ve EGF-benzeri domainler (Tie-1 ve Tie-2) tarafından kontrol edilmektedir (11). Tie-2 endotelial hücrelerde eksprese edilen bir tirozin kinazdır. Tie-2' nin, Ang-1, Ang-2 ve Ang-4 olmak üzere bilinen üç ligandı vardır. Ang-1, perisitler gibi stabilizasyonu destekleyen hücreler aracılığıyla kapillerin

bütünlüğünü korur (41). VEGF ve Ang-2 anjiyogeneze neden olurken, Ang-2' nin çekilmesi kapillerin regresyonuna neden olur (11).

Anjiyogenez esnasında damarlar VEGF' e cevap olarak genişlerler ve geçirgen olurlar. Böylece endotel hücrelerinin migrasyonu için plazma proteinlerinin yapı iskelesi oluşturmaya izin verirler. Bu artan geçirgenlik, fenestrasyonların formasyonu, vezikülo-vasküler organeller ve vasküler endotelial VE-kaderin aracılığıyla sağlanır (41).

Anjiyogenezin bu akışı sırasında endotelial hücrelerde çok sayıda molekül ekspresyon edilir. Matriks degradasyonu için metalloproteinazlar (MMPs) ve plazminojen aktivatörleri (PAs), hücre adezyonu ve migrasyonu için integrinler ve tüp oluşumunu için VE-kaderin bu moleküllere örnektir. Bu moleküllerin endotelial hücrelerde ekspresyonunun regüle edilmesinin araştırılması, anjiyogenez mekanizmasının anlaşılabilmesi için önemlidir. Ayrıca birçok transkripsiyon faktörü endotelial hücrelerde ekspresyon edilir ve anjiyogeneze önemli rol oynar (39). Hücre adezyon moleküllerinin anjiyogeneze önemli rol oynadığı da bilinmektedir. Yeni kapiller gelişiminde, hem büyüme faktörlerinin hem de integrinlerin koordinasyonları, endotelial hücrelerin yaşamalarını, proliferasyonlarını ve invazyonlarını düzenler. Artan anjiyogenezin kontrolü, hedef büyüme faktörleri, onların reseptörleri ve integrinler tarafından planlanır. Anjiyogenez kontrolü yapan önemli integrinler;  $\alpha V\beta 3$  ve  $\alpha V\beta 5$  integrinlerdir. bFGF ve anti  $\alpha V\beta 3$  kombinasyonunun korneal anjiyogenezi inhibe ettiği gözlemlenmiştir (11).

### **2.2.3. Anjiyogenik Faktörler**

Proanjiyogenik faktörlerden bazıları VEGF, asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü (aFGF, bFGF), anjiyogenin, Ang-1, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF, trombosit kökenli endotel büyüme faktörü (PDEGF) ve diğerleri olarak sıralanabilir (Çizelge 2.3). Günümüzde keşfedilen ve yapısal olarak çeşitlilik gösteren anjiyogenez inhibitörleri geniş bir ailedir ve bilinen başlıca önemli antianjiyogenik faktörler; endostatin, angiostatin, trombospondin-1, fibronektin, vazostatin, heparindir. Çizelge 2.3' te başlıca proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler yer almaktadır (8, 10, 11, 41, 46, 47 ).

**Çizelge 2.3. Proanjyogenik ve Antianjyogenik Faktörler (8, 10, 11, 41, 46 ).**

**Proanjyogenik Faktörler**

**Antianjyogenik Faktörler**

VEGF	Endostatin
Anjyogenin	Angiostatin
Ang-1	Trombospondin-1
TNF- $\alpha$	Vazostatin
TGF- $\alpha$ - $\beta$	Fibronektin
aFGF/ bFGF	Heparin
PDEGF	Vaskülostatin
PGF (Plasental Büyüme Faktörü)	PF-4 (Trombosit Faktör-4)
HGF (Hepatosit Büyüme Faktörü)	Talidomid
EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)	Anti-VEGF
IL-8 (İnterlökin -8)	Retinoidler
Proliferin	Restin
Follistatin	IL-12
Leptin	

Kanser hücreleri VEGF, anjyopoetinler, bFGF, EGF, TGF- $\beta$  gibi birçok anjyogenik faktörü stimüle etmekte yeteneklidirler. Tümör hücrelerine ek olarak; tümör endotelyal hücreleri, stroma hücreleri, endotelyal progenitör hücreleri ve makrofajlar da anjyogenez modülatörlerini salgılayabilmektedirler (42).

Endotelyal hücreler çeşitli hastalık durumlarında organ fizyolojisinde ve patolojisinde önemli rol üstlenen kan ve doku arasındaki yapıdır. Buna en güzel örnek anjyogenezde endotelyal hücrelerin metastaz ve tümör gelişimine katkıda bulunmasıdır. Son zamanlarda çeşitli antianjyogenik faktörlerin endotelyal hücrelerin gelişimini inhibe ettiği tanımlanmıştır (48). Ayrıca VEGF ve FGF nin damar membranının degradasyonuna neden olan çeşitli proteazları ve plazminojen aktivatörlerini salgılaması için endotelyal hücreleri stimüle ettiği kanıtlanmıştır (49). Endotelyal hücreler migrasyonla ve proliferasyonla lümen için yeni bir form oluştururlar. Sonunda endotelyal hücreler yeni bir membran oluştururlar ve büyüme faktörleri salgırlar. Bu olay kompleks bir süreçtir ve çeşitli faktörlerin ve reseptörlerin dengesi sayesinde tamamlanır (49).

### 2.2.3.1. Proanjjiyogenik Faktörler

#### 2.2.3.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGF ailesi endotelyal hücrelerden regüle edilen, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri süperailisinin üyesi olan, hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogeneizde önemli rol oynayan bir büyüme faktörü grubudur (10, 12).

İlk olarak 1971 yılında Judah Folkman kanser tedavisinde anjiyogenez inhibisyonunun işe yarayabileceği düşüncesiyle anjiyogenez faktörlerini belirlemeye yönelik çalışmalar başlatmıştır (10). 1983 yılında Senger ve arkadaşları Gine domuzu derisinde vasküler sızıntıyı indükleyen bir protein bulmuşlardır. Bu çalışmada VEGF, tümör kan damarlarına bir büyüme faktöründen daha fazla permeabilite özelliği gösteren spesifik bir mediyatör olarak değerlendirilmiş ve tümör hücreleri tarafından salgılanan bir protein olarak Vasküler Permeabilite Faktörü (VPF) adı verilmiştir (38, 50, 51). 1989' da ise, Ferrara, Henzel, Plouët ve arkadaşları bundan bağımsız olarak VEGF' ten bahsetmişlerdir ve klonlamasını gerçekleştirmişlerdir. VEGF ve VPF' nin ekspresyonu ve klonlanması, VEGF ve VPF' nin aynı aktiviteleri gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır (51, 52).

VEGF kuvvetli bir permeabilite faktörü olarak plazma fibrinojenlerini düzenler ve invazyon sırasında hücre migrasyonunu sağlayan fibrin yapısının formasyonuna sebep olur; endotelyal büyüme faktörü olarak ise, gelişen tümör etrafında oluşan yeni kan damarları için proliferasyona uğrayan endotelyal hücrelerin stimülasyonundan sorumlu tutulur (50). VEGF' in vasküler permeabiliteyi arttıran özelliği inflamasyon ve diğer patolojik süreçlerdeki öneminin büyük olduğunu, güçlü, yayılabilir ve endotelyal hücrelere spesifik olmasının ise bu molekülün fizyolojik ve patolojik anjiyogeneizde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (37, 51).

VEGF, endotelyal hücreler için özgül olan, 6. kromozomun kısa kolunda (6P12) lokalize olmuş ve 45 kDA molekül ağırlığına sahip bir sitokindir (53). VEGF' in endotelyal hücreler için spesifik mitojen olması, VEGF' i bu hücreler için yaşamsal faktör yapar (13). Endotelyal hücre proliferasyonunu indükleyen VEGF, tümör gelişimi ve metastazi için önemli olan bir faktör olup hipoksi sırasında ekspresyonu artar (54). Tümör anjiyogenezi biyolojisinde birçok molekülün anjiyogenezin ilerlemesi için

önemli olduğu saptanmıştır. Bunların en dikkat çekici olanları VEGF ailesidir çünkü VEGF neredeyse bütün tümörlerde eksprese edilir (39).

VEGF, kan damarlarının büyümesini sağlamak için hipoksi hücreler tarafından kullanılan bir anahtardır ve endotelial hücrelerin yüzeyinde reseptörlerine bağlanarak yeni damar oluşumunu sağlar (45). Hipoksi indüklü VEGF ekspresyonu tümör anjiyogenezinde temel bir rol üstlenmektedir (37, 55). Tümörün büyümesiyle hipoksi meydana gelir ve gelişen hipoksi proanjiyogenik molekülleri uyararak anjiyogenezi başlatır (10). VEGF üretimi tümörler tarafından eksprese edilen PDEGF, EGF, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 ve IL- $\beta$ 1 gibi faktörler tarafından başlatılabilir ancak hipoksinin tek başına VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyen en önemli etken olduğu bilinmektedir (10, 42, 51). Ayrıca; estrogen ve tiroid stümlasyon hormonu gibi hormonlar ve IL-6, IL-1 gibi sitokinler de birçok hücre tiplerinde VEGF' i indüklemektedir (42). Bunların tersine karbonmonoksit (CO) VEGF' i inhibe etmektedir (10). Hipoksi durumunda VEGF aktif halde olduğu için ilk hazırlanan antianjiyogenik ve antitümör ilaçları bu faktörü bloke etmek üzere tasarlanmıştır. Fakat spontan tümör oluşmuş deneysel farelerde anti VEGF kullanımı yeteri derecede etkili olmamış, uzun süreli ilaç kullanımı sonucunda tümör hücrelerinin farklı anjiyogenik faktörler kullanarak anjiyogenezi sürdürdüğü görülmüştür (56).

VEGF vasküler proliferasyonu ve permeabilityi regüle ettiği gibi yeni oluşan kan damarlarında antiapoptotik faktör olarak da rol oynamaktadır (46, 55). İnsan endotelial hücrelerinde VEGF yaşamsal aktiviteye uygun olarak antiapoptotik proteinler olan Bcl-2' yi de indüklemektedir (51). Endotelial hücrelerin anjiyogenik fenotipe dönüşmesi endotelial hücre apoptozisinin inhibisyonunu sağlayabilir. Çalışmalar TNF- $\alpha$  tarafından indüklenen büyük damar endotelial hücrelerinde apoptozisinin VEGF tarafından inhibe edildiğini göstermektedir. Bu da VEGF' in anjiyogenezi sadece endotelial hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederek değil, aynı zamanda endotelial hücre apoptozisini inhibe ederek de desteklediğini göstermektedir (13).

Malign tümörlerde VEGF ekspresyonu oldukça yüksek seviyededir (55). VEGF varlığı özellikle, HCC hücreleri, Kupffer hücreleri, hepatik makrofajlar, portal sistemlerin ekstraselüler matriksleri, yıldız hücreler ve sinüzoidal hücrelerde

saptanmıştır (10). VEGF' in kardiyovasküler sistem gibi birçok organ, doku ve sistemde gelişim, hemostaz ve yaşamsal bir faktör olarak elzem olduğu kabul edilmiştir (38).

VEGF; 7 intron tarafından ayrılmış 8 ekson içeren bir gen tarafından kodlanmıştır. Kod bölgesinin uzunluğu yaklaşık 14kb' dır (50, 53). Ekson 1, 2, 3, 4, 5 ve 8 bütün izoformlar için ortaktır (50). Peptit sinyalinin oluştuğu VEGF' in ilk 26 amino asiti, VEGF' in salgılanan bir protein olduğunu gösterir (37). Günümüzde VEGF ailesinin VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Plasenta Büyüme Faktörü (PIGF) olmak üzere bilinen 6 üyesi bulunmaktadır (46, 57). VEGF ailesinde en tanınmış üye VEGF diye de bilinen VEGF-A' dır ve anjiyogenezde rol alan en önemli anjiyogenik faktördür (12). Bu major VEGF alttürlerinin içinde birde çoklu izoformlar vardır. VEGF-A' nın günümüzde bilinen 7 tane izoformu bulunmaktadır. Bunlar; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>148</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>206</sub>' dır. Yanlarında yazan sayılar amino asit sayılarını göstermektedir (10, 46). VEGF izoformlarının en önemli karakteristik özelliği heparine bağlanmalarıdır. Bu özelliği sayesinde salgılanan VEGF' in ekstraselüler matrikste birikeceği veya açığa çıkacağı tanımlanabilir ve böylece diğer hücrelerle etkileşimi gerçekleşebilir (37). Nativ VEGF basit, heparin bağlı, homodimerik bir glikoproteindir. Bu özelliklere ise major bir izoform olan VEGF<sub>165</sub> uymaktadır (58). 6. eksonunda kodlanmamış eksik amino asiti olan VEGF<sub>165</sub>, ortak olan eksonlar dışında ekson 7 de içermektedir (37, 50). VEGF<sub>121</sub> ve VEGF<sub>189</sub> dokularda eksprese edilen ve çoğunlukla rastlanılan faktörlerdir. Bunun tersine VEGF<sub>206</sub> nadiren görülen bir formdur (59). VEGF<sub>189</sub> ortak olan eksonlar dışında ekson 6 ve 7' yi de içermektedir. Bu eksonlar VEGF domaininin ekstraselüler matriks bağlanmasını şifreler. Bu domain, heparin proteoglikanlara ve diğer matriks proteinlerine bağlanabilmektedir. Bu sebeple sekresyondan sonra VEGF<sub>189</sub> ve VEGF<sub>165</sub>' in bir bölümü hücre membranına ve ekstraselüler matrikse bağlanır. Heparinler, plazmin, ürokinaz tip plazminojen aktivatörü ve MMP bağlı VEGF' in salınımını sağlar ve biyolojik aktivitesini regüle eder (50). VEGF<sub>121</sub> ise 6. ve 7. eksonunda kodlanmamış amino asit bulunduran ve heparine bağlanmayı başaramayan zayıf asidik polipeptittir (58). Literatürde en az rastlanılan izoformlar olarak VEGF<sub>145</sub> ve VEGF<sub>183</sub> bilinmektedir (37). VEGF-B, 167 amino asit içeren bir protein olup ilgili reseptörüne bağlandığında monosit aktivasyonunu sağlamaktadır (60). VEGF-A genel olarak anjiyogenezde rol alırken, VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyogenezde görülür (42). Yapılan çalışmalar lenf

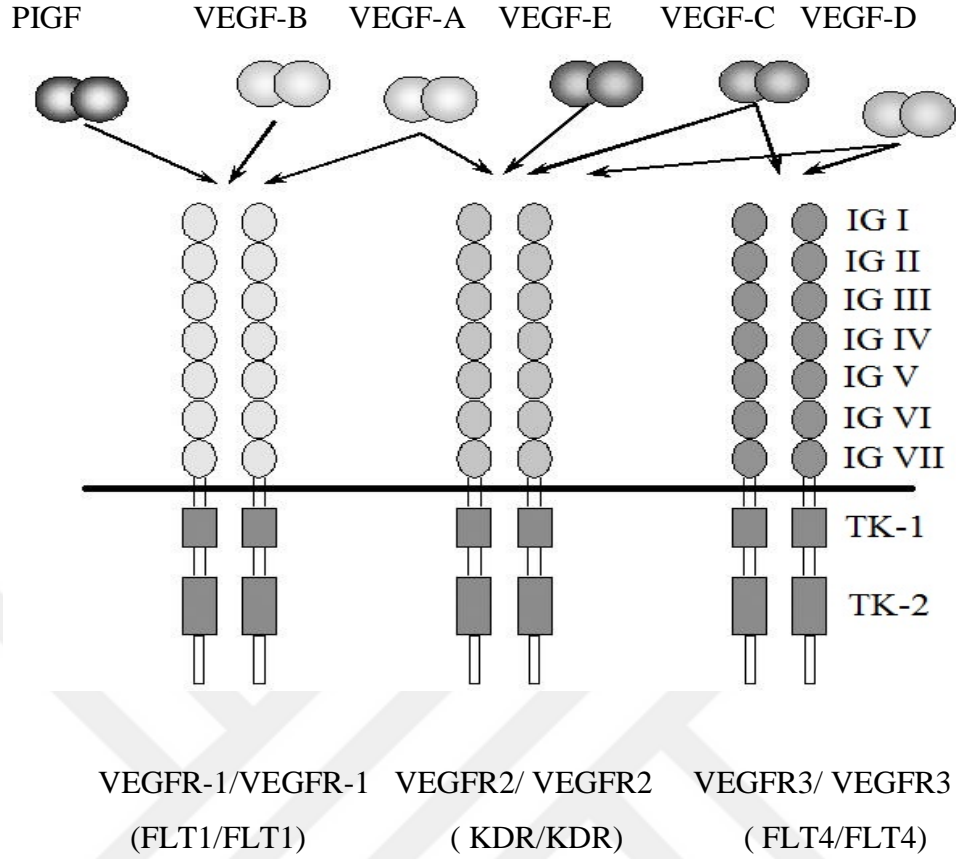
nod metastazlarında VEGF-C ekspresyonunun meydana geldiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, VEGF-C' nin malign tanı ve tedavide ümit verici olduğunu gösterirken klinik olarak VEGF-C ekspresyonunun önemi henüz ispatlanmamıştır (12). VEGF-E' nin ise endotelial hücrelerin proliferasyon, kemotaksis ve tübüler yapı formasyonuna neden olduğu kanıtlanmıştır (37).

Bu VEGF ekspresyonunun, vasküler endotelial hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonu ile direk ilgili olan VEGF<sub>120</sub> ve VEGF<sub>164</sub>' nın artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu izoformlar aynı zamanda makromoleküllerin sirkülasyonunu sağlayan mikrodamarların permeabilitesini arttırmaktadır (61).

VEGF ailesinin üyeleri, endotelial hücre membranında lokalize olmuş reseptörlerle etkileşime girerek biyolojik aktivitelerini gösterirler (37). VEGF üyelerinin 3 önemli reseptöre afinite gösterdiği belirlenmiştir (62, 63) ;

1. VEGFR-1/ Flt-1 (VEGF Reseptör 1)
2. VEGFR-2/ Flk-KDR (VEGF Reseptör 2)
3. VEGFR-3/ Flt-4 (VEGF Reseptör 3)

Bu reseptörler "Reseptör Tirozin Kinaz" (RTK) süper ailesinin üyeleridir. Aynı zamanda VEGF' in etkileşimde bulunduğu iki tirozin kinaz daha vardır; nöropilin-1 ve nöropilin-2 (38). VEGF' in çeşitli üyeleri her bir reseptör için farklı bağlanma afiniteleri göstermektedir (Şekil 2.5) (64).



Şekil 2.5. VEGF ailesinin VEGF reseptörleri ile etkileşimi (37)

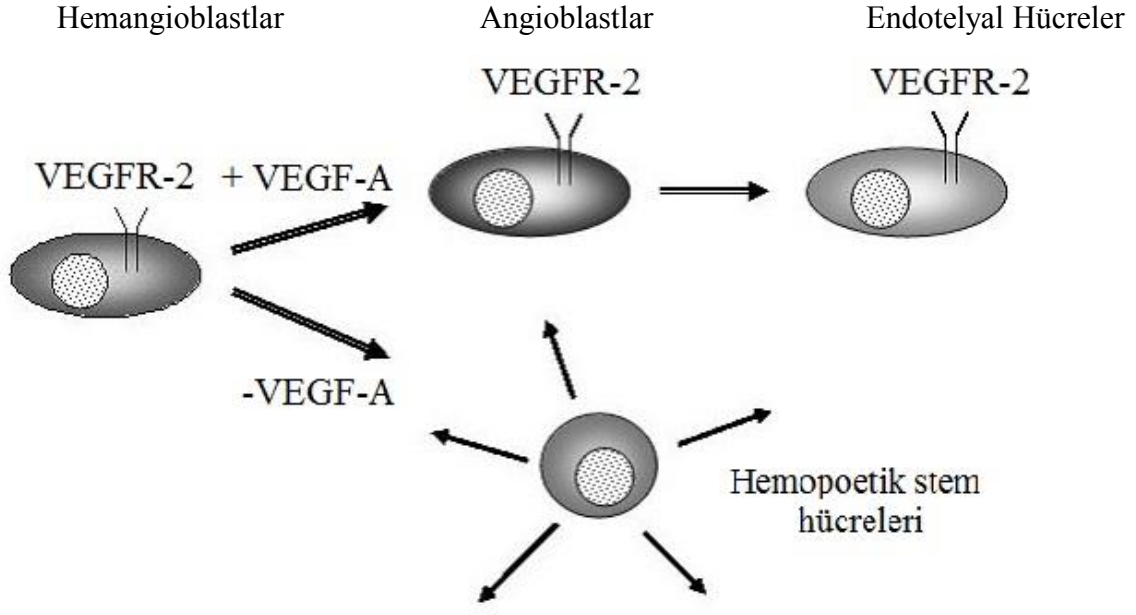
VEGF reseptörlerinin ekstraselüler bölgesi 7 immünoglobulin domaini tarafından biçimlendirilmiştir. İntraselüler bölümde ise bu reseptörlerin tirozin kinaz domaini 2 parçaya ayrılmıştır (Şekil 2.5) (65, 66). VEGF genellikle VEGFR-1/Flt-1 ve VEGFR-2/Flk-KDR' nin bu ekstraselüler ligand bağlı domainlerine ve intraselüler proteinkinaz domainlerine ilgi duyar (38). Tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonuna ilişkili olarak VEGF reseptörlerinin de endotelial hücreler tarafından regülasyonunun arttırıldığı görülmüştür (54).

**VEGFR-1/ Flt-1;** Anjiyogenez gelişiminde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Bunun yanı sıra, monosit migrasyonu, endotelial hücre progenitörlerinin kuvvetlendirilmesi, ölümcül hücrelerin yapışkan özelliğini arttırmak gibi olaylarda da önemli rol oynamaktadır (64). VEGFR-1' in vasküler endoteliumda eksprese edildiği görülmektedir (39). VEGFR-1; VEGF-A, VEGF-B ve PIGF ile etkileşime girebilir (Şekil 2.5). VEGF-B ve PIGF VEGFR-2' ye bağlanmazlar ve VEGFR-1' e bağlanmak için de VEGF-A ile yarışır (37).

**VEGFR-2/ Flk-KDR;** Bu reseptör, hem embriyonik anjiyogenezde hem de hematopoez de anahtar rol oynamaktadır. Embriyonik gelişimde olan ve VEGFR-2 geni inaktif olan sıçanların 8,5-9,5 gün arasında öldükleri görülmüş ve vaskülogenez durumunda da endotelial hücrelerde farklılaşma ve hematopoezis görülmemiştir (67). Bu bilgiler VEGFR-2' nin hemangioblast adı verilen hematopoetik stem hücreleri ve endotelial hücreleri için progenitör ekspresyonu yaptığını desteklemektedir. VEGF-A varlığında hemangioblastlar önce angioblastlara daha sonrada endotelial hücrelere farklılaşırlar. Ancak VEGF-A yokluğunda hemangioblastlar hematopoetik stem hücrelerine dönüşürler (68). (Şekil 2.6). VEGFR-2' nin VEGF-A' nın biyolojik etkisinin temel mediyatörü olduğu kabul görmüştür (37). VEGFR-2' ye büyüme faktörlerinden VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E bağlanabilirler (69). Anjiyogenezde VEGF' in major reseptörü olan bu reseptör, mikrovasküler permeabiliteden, endotelial hücre proliferasyonundan ve tümör hücre migrasyonundan sorumludur (50). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu ile fosfoinositol 3 kinaz, fosfolipaz C ve ras GTPaz gibi sinyal iletim proteinleri fosforile edilir ve bu fosforilasyon sayesinde endotelial hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve differansiasyonu sağlanır (10, 39).

Hipoksinin VEGFR-1 ve VEGFR-2 genlerinin transkripsiyonal regülasyonunda farklılık yarattığını kanıtlamıştır. Hipoksinin VEGFR-1' i direk olarak regüle ettiği görülmüştür (51).

Özellikle kanserde, normal ve patolojik anjiyogenezin önemli olduğu vurgulanmaktadır. Bu bağlamda; VEGFR inhibitörleri farklı kanser tedavilerinde ümit verici olmaktadır. Bunlardan birisi de VEGFR-2' nin spesifik inhibitörü olan SU 1498' dir (70).



Şekil 2.6. VEGF-A' nın Bağlanması ve VEGFR-2' nin Farklılaşması (37).

**VEGFR-3/ Flt-4;** VEGFR-1 ve VEGFR-2' nin vasküler endotelyumda lokalize olmalarına ve eksprese edilmelerine karşın VEGFR-3 lenfatik endotelyumda eksprese edilmektedir (42, 39). İntraselüler sinyal kaskadındaki bozukluk bu reseptörün lenfanjiyogenezi etkilemesiyle ilişkilendirilmiştir. Buna karşılık, lenfatik damar endotelyumu hücre kültüründe, VEGFR-3 ve sinyal kaskadı ilişkisi hakkındaki incelemeler sadece VEGFR-3 aktivasyonunun tek başına bile hücreleri apoptozise karşı koruduğunu, hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu sağladığını göstermektedir. VEGFR-3; VEGF-C ve VEGF-D' ye bağlanmaktadır (Şekil 2.5) (37).

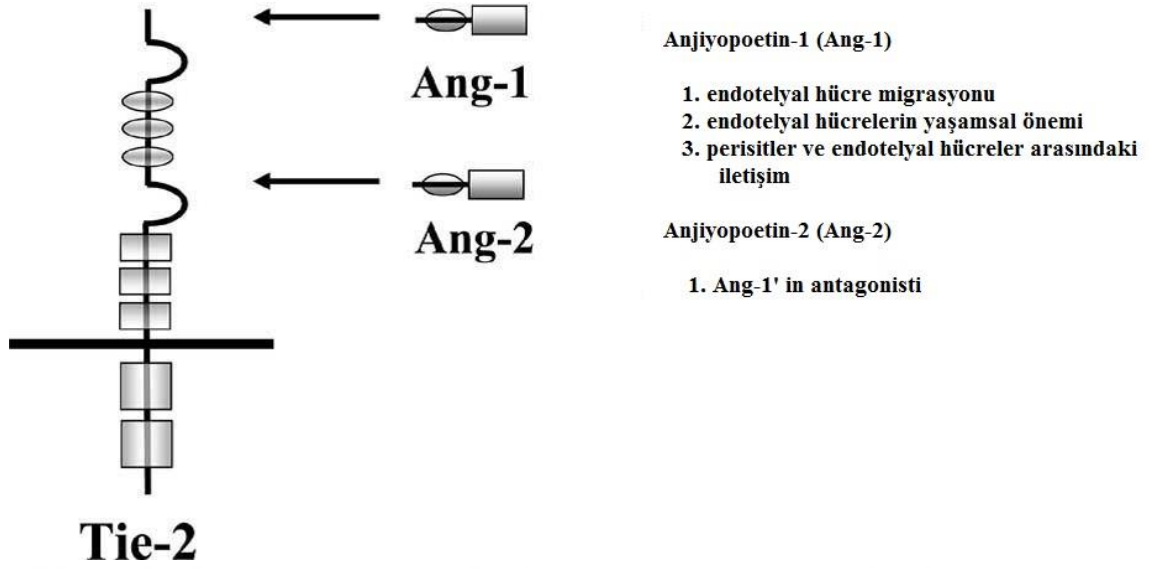
Nöropilin-1 ve Nöropilin-2, VEGF ailesinden birçok üye ile etkileşime giren ve anjiyogenezde önemli rol üstlendiği düşünülen transmembran glikoproteinleridir. Bu glikoproteinler, VEGF ailesinin ligandlarının VEGF reseptörlerine bağlanma afinitesini artırır bununla birlikte intraselüler sinyal gerçekleşir. VEGF' in nöropilin-1 ve nöropilin-2' ye bağlanması endotelyal mitogenezin ve kemotaksisin artmasına neden olur (71). Embriyoda nöropilin-1 kan damarları oluşumu için önem taşırken, nöropilin-2 lenfatik damar oluşumu için önemlidir (39).

### 2.2.3.1.2. Anjiyopoetinler ve Tie Reseptörleri

Anjiyopoetinler proanjiyogenik faktörler arasında yer almaktadır. Tıpkı VEGF ve VEGF reseptörleri arasındaki ilişki gibi anjiyopoetinler ve ligandları arasındaki ilişki de embriyogenez sırasındaki vasküler sistemin gelişimi için oldukça önemli ve elzemdir (37). Vasküler endotelial hücrelere özgü olan ve bu bağlamda ilk keşfedilen reseptörler Tie-2 ve Tie-1' dir. Yancopoulos tarafından Tie-2' nin ligandları olan Ang-1 ve Ang-2 keşfedilene kadar bu reseptörün yalnız bir reseptör olduğu zannediliyordu (46). Embriyonik gelişim sırasında endotelial hücreler Tie-1 ve Tie-2' yi eksprese ederler. Tie-2 reseptörleri aynı zamanda yetişkinlerde hareketsiz endotelial hücreler tarafından eksprese edilir ve anjiyogenez için elzemdir (Şekil 2.7) (49).

Ang-1' in endotelial hücrelerden salgılanan Tie-2 ile bağlanarak endotelial hücreler ve perisitler arasındaki etkileşimi desteklediği ve bu yolla vasküler sistemin matürasyonunu stabilize ettiği düşünülmektedir (72, 73). VEGF yokluğunda Ang-2 vasküler regresyonu sağlarken VEGF varlığında anjiyogenezi stimüle etmektedir (37). Bilinen dört anjiyopoetin arasında Ang-1 ve Ang-2, Tie-2' ye bağlanmak isteyen en karakterize sitokinlerdir (74). Ang-1 normal yetişkin dokularında eksprese edilirken Ang-2 genelde tümör ve kronik enflamasyonda eksprese edilir (70).

Transgenik farelerin embriyonik gelişiminde Tie-2 inaktivasyonu durumunda farelerin 9,5- 10,5' uncu günler arasında öldükleri görülmüştür (37). Yine benzer farelerde benzer bir fenotipte Tie- 2 reseptörünün Ang-1 ligandına bağlanmadığı veya Ang-2' nin hiperekspresyona uğradığı görülmüştür (76). Bu sonuçlar Ang-1 ve Ang-2 arasındaki yapısal benzerliğe rağmen Tie-2' yi farklı yönettiklerini göstermektedir. Ang-1, Tie-2 fosforilasyonunu stimüle ederken, Ang-2 ile etkileşiminin reseptörün aktivasyonu ile sonuçlanmadığı görülür. Bu durumda Ang-2, Ang-1' in yarışmalı (kompetitif) inhibitörüdür (77). Deneysel ortamda Ang-1 endotelial hücrelerin kemotaksisine neden olurken proliferasyonunu indüklemeyiz (78).



Şekil 2.7. Ang-1 ve Ang-2' nin Tie-2 reseptörü aracılığıyla fizyolojik rolleri (49).

### 2.2.3.1.3. Fibroblast Büyüme Faktörü

FGF' ler heparin bağlayan proteinlerin bir ailesidir ve dokuz farklı üyeden oluşmaktadırlar (42, 48). En iyi bilinen FGF olan FGF-1 ve FGF-2 anjiyogenez indüktörleri olarak tanımlanmışlardır ve epiblast hücrelerinin endotelial hücrelere doğru proliferasyonunu ve differansiasyonunu indüklerler (42). FGF-1 ve FGF-2 izoelektirik noktalarının (pI) farklılığından ötürü birbirlerinden ayırt edilmektedir. Asidik FGF olan (aFGF) FGF-1' in pI' sı 4,5-6 iken; bazik FGF olan (bFGF) FGF-2' nin pI' sı 9,6-9,8 olarak belirlenmiştir (79, 80). Fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak bilinen bFGF, endotelial hücrelerin çoğalması, migrasyonu ve anjiyogenez uyarılmasıyla karakterize edilmiş aynı zamanda birçok hücre, doku ve organ sistemlerinin gelişiminde ve fonksiyonunda etkili olan önemli bir büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır (81, 82, 83).

### 2.2.3.2. Antianjiyogenik Faktörler

#### 2.2.3.2.1. Trombospondin-1

Trombospondinler ekstraselüler matriks proteinlerinin bir ailesidir. CD36, TSP-1' in antianjiyogenik aktivitesi için gerekli olan ve mikrovasküler endotelium üzerinde

bulunan önemli bir reseptördür. TSP-1 ve reseptörünün etkileşimi endotelial hücre apoptozisi ile sonuçlanan intraselüler olayların bir sıralamasıdır (42). Bouck ve arkadaşları TSP' nin antianjiyogenik aktivitesinin tümör represör ekspresyonu ile ilişkisini bulmuştur (47). Daha sonra ki çalışmalar ile TSP' nin endotelial hücre proliferasyonu inhibitörü olduğu desteklenmiştir (84).

#### **2.2.3.2.2. Angiostatin**

Angiostatin anjiyogenez inhibitörü olabilecek, spesifik olarak izole edilmiş ilk moleküldü (47). 38- kDa plazminojen fragmenti olan angiostatinin tümör neovaskularizasyonunu ve metastatik büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür. Angiostatin ekstraselüler matriks birikimini inhibe eden bir faktördür. Ekstraselüler matriks birikiminin inhibe edilmesi de endotelial migrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (42). Angiostatin endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonu için endotelial spesifik inhibitör olarak kabul görülmüştür. Angiostatin tedavisi, tümörlü farelerde primer tümörün regresyonuna neden olur ve vaskularizasyonu durdurur (47).

#### **2.2.3.2.3. Endostatin**

Endostatin Kolajen Tip XVIII' in 20 kDa büyüklüğündeki fragmentidir. Mikrovasküler endotelial hücre proliferasyonunu inhibe eden aktif bir endotelial spesifik inhibitörü olan endostatin, endotelial hücre migrasyonunu da güçlü bir şekilde inhibe eder ve endotelial hücre apoptozisine neden olur. Endostatin, metastaz oluşumu ve gelişimini inhibe etmenin yanı sıra, primer tümör gelişimini de inhibe eder (42, 47).

### **2.2.4. Fizyolojik ve Patolojik Anjiyogenez**

Anjiyogenez genellikle bütün doku ve organlarda meydana gelir ve fizyolojik durumlarda da, kronik karaciğer hastalıklarını da kapsayan patolojik durumlarda da kritik bir basamak olarak değerlendirilir.

#### **2.2.4.1. Fizyolojik Anjiyogenez**

Fizyolojik anjiyogenez stabil bir olaydır ve kendi kendini sınırlandırabilir. Fizyolojik anjiyogenez oluşumunda, anjiyogenezi başlatan herhangi bir uyarı proteazları aktive eder. Bazal membran damar duvarındadır ve bu bölgeden kapiller

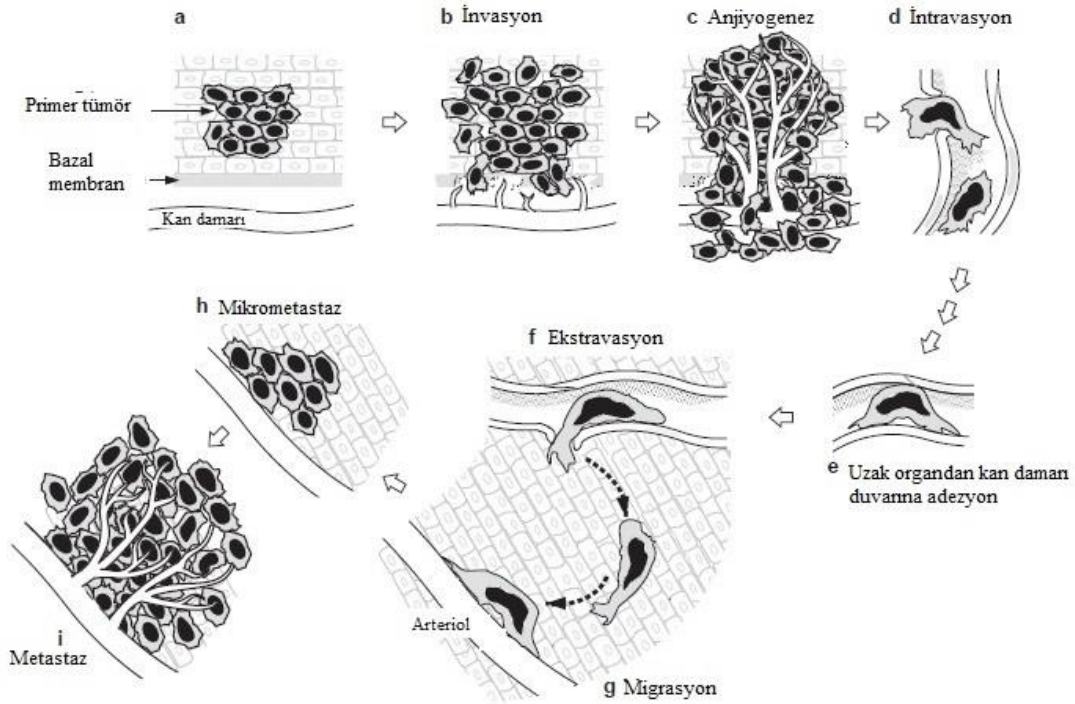
tomurcuklanma oluşur. Anjiogenik uyarıya doğru endotel hücrelerinin migrasyonu gerçekleşir ve bu bölgede bir lümen oluşur. Yeniden bir bazal membran oluşumu ile yeni damar oluşumu gerçekleşmiş olur ve fizyolojik anjiyogenez tamamlanır (8, 10, 43). Fizyolojik anjiyogenez yetişkinlerde yumurtalık ve endometriyum gibi belirli bölgelerde meydana gelir. Fizyolojik anjiyogenezin bu süreci geçici ve normaldir (39). Fizyolojik anjiyogenez kontrollü ve sınırlı olmasına karşın, patolojik anjiyogenez kontrolsüz ve ilerleyicidir (8,9, 10). Karaciğerde fizyolojik ve patolojik anjiyogenez, HCC ve metastatik karaciğer kanseri gibi fibrogenik karaciğer hastalıklarında, kronik inflamasyon durumunda ve iskemik durumlarda karaciğer rejenerasyonu sırasında meydana gelebilir (7).

#### **2.2.4.2. Patolojik Anjiyogenez**

Patolojik anjiyogenez stabil bir olay değildir. Patolojik anjiyogenezde, çeşitli çevresel ve genetik faktörler, tümör inhibe edici genlerin inaktivasyonuna ve çeşitli tümör indükleyici genlerin aktivasyonuna neden olurlar. Böylece anjiyogenez düzenleyen pozitif ve negatif regülatörlerin var olan dengesi anjiyogenez lehine döner (8, 10, 43). Anjiyogenez tümör gelişiminde, metastazında ve neoplastik süreçte önemlidir. (44). Herhangi bir dokuda olduğu gibi bir tümör nodülü de yaşamsal aktivitesini sağlamak ve büyümek için oksijen ve besine ihtiyaç duyar. Kan damarı sağlanamayan tümör nodüllerinin hacminin 2-3 mm<sup>3</sup> ü geçemediği ve hipoksiden dolayı hücre ölümü gerçekleştiği bilinmektedir (37, 39). Tümör anjiyogenezinde birçok ardışık basamak aydınlatılmıştır. Olgun kapillerde damar duvarı endotel hücre dizisinden, bazal membrandan ve perisitlerden oluşur. Tümör hücreleri tarafından sentezlenen anjiyogenik faktörler, endotel hücre reseptörlerine bağlanır ve anjiyogenezin ardışık olaylarını başlatır (42). Vaskülerize bir tümörde bütün tümör dansitesi farklılıklar gösterebilir. Bu durum anjiogenik aktiviteyi heterojen yapar (44). Bir tümörün büyük bir ebata ulaşabilmesi ve metastazının sağlanabilmesi için yeni oluşmuş kan damarları ağına ihtiyacı vardır (39, 41). İlk kez anjiyogenik faktör olarak FGF tespit edilmiştir. Bunu makrofajlar, mast hücreler ve lenfositler gibi tümör oluşumunu etkileyen anjiyogenik faktörlerin belirlenmesi izlemiştir. Güncel çalışmalar ise VEGF ve FGF ailesine odaklanmıştır. Anjiyogenik inhibitörlerin; anti-tümör etkeni olarak faydalı olabileceği düşünülmektedir (47).

### 2.2.5. Anjiyogenez ve Metastaz İlişkisi

Güncel çalışmalar, tümör regresyonunun meydana gelmesinde ve yayılmasında yeni kan damarları oluşumu ve bu konuda anjiyogenik inhibitörlerin etkisine odaklanmıştır. Anjiyogenez tümör metastazında kritik bir ögedir ve metastaz oluşumunda yüksek vasküler tümörler, düşük vasküler tümörlere oranla daha fazla metastaz yapma potansiyeline sahiptirler. Bunun da ötesinde, anjiyogenez tümör metastazında tümör hücrelerine doğru rotayı belirleyerek primer alan ve kan akışını kolaylaştırır ve bu önemli etkiyle tümör yayılımını sağlar (47) (Şekil 2.8). Anjiyogenez ve metastaz arasındaki ilişki; anjiyogenez inhibitörleri ile tedavi edilen primer tümör oluşturulmuş deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir. Primer tümörlerdeki vasküleritenin azalması adeta metastatik kolonilerin azalmasıyla ilişkilidir (85). Anjiyogenik inhibitörler, aynı zamanda metastazı da inhibe etmektedir (86, 87).



Şekil 2.8. Anjiyogenez ve Tümör Metastazı İlişkisi (47).

### 2.2.6. Anjiyogenezin Siroz ve Hepatoselüler Karsinomayla İlişkisi

Kronik karaciğer hastalıkları; herhangi bir etiyolojik olay ile karaciğerin hasarının tekrarlanması ile karakterize, viral faktörler tarafından oluşan enfeksiyon (HCV, HBV), alkol ve otoimmün sebepli rahatsızlıklar, süregelen inflamasyon ve fibrojeniz ile sonuçlanan hastalıklardır. Karaciğer sirozuna ve hepatik yetmezliğe sebep olan ECM birikiminde major destekleyici güç yara iyileşmesine cevabın kronik aktivasyonudur. Oksidatif stres, epidermal-mezenşimal etkileşimlerdeki değişiklik veya epitelyalin mezenşimale dönüşüm süreci, fibrojenizin sirozla sonuçlanan mekanizmasını açıklar (7, 88-90). Bu sıralama boyunca siroz, fibrotik septa tarafından çevrelenen ve ayrılan parankimadaki rejeneratif nodüllerin formasyonu ile karakterize fibrozun gelişmemiş basamağı olarak kabul görür ve anjiyo yapısındaki önemli değişikliklerle ilişkilendirilir. İnsan sirotik karaciğerlerinde; anjiyogenez, etiyolojisi ne olursa olsun, fibrojeniz oluşumuna ve vasküler değişikliklere önemli katkıda bulunmaktadır ve devam eden fibroz, hücre hasarı, ölümü ve inflamasyon cevap ile karakterize olarak kronik karaciğer hastalıklarında meydana gelmektedir (7, 91, 92). Bununla beraber anjiyogenez sinüzoidlerin kapilarizasyonuna ek olarak fibrotik septa formasyonunun oksijen verimini ve kan akışını arttırmasıyla sonuçlanır (93, 94). İntrahepatik şantlar ve sinüzoidlerin kapilarizasyonu sirozun kanıtlanmış karakteristik özellikleridir. Bu vasküler morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler, fibrotik karaciğerde kronik hipoksiyi indüklemekte ve böylece anjiyogenik bir cevap sağlamaktadır (61). Karaciğer hasarında hepatik stellat hücreler aktive edilir, çoğalır, matriks degradasyonuna neden olur ve kolajen sentezi gerçekleşir. Hepatik stellat hücrelerin aktive olmasıyla VEGF ve VEGF reseptörleri aktive olur (95). HCC' li olan veya olmayan sirotik karaciğerli hastalarda, VEGF' in yüksek regülasyonu, siroz ilişkili anjiyogenezden sorumludur. VEGF ve FGF' nin tümör gelişimi ve yara iyileşmesi ile ilişkili vasküler proliferasyondaki rolleri birçok farklı organda geniş çapta gösterilmiştir. Ayrıca hipoksinin, oksijen teminini arttırmak için lokal kapiller proliferasyonunu arttırması amacıyla; VEGF' in temel indükleyicisi olduğu saptanmıştır. Bu vasküler cevap, faydalı etkilerin yanı sıra tümör büyümesi ve proliferatif retinopatide görüldüğü gibi zararlı etkilerde sağlayabilir (61). İnflamasyonda önemli rol oynayan HGF, PDGF ve NO gibi sitokinler veya mediyatörler anjiyogenez oluşumunda

üretirler. Anjiyogenezin kronik karaciğer hastalıklarında akut inflamasyonu, kronik inflamasyona çevirme konusunda önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir (7, 96).

Deney hayvanları çalışmaları, karaciğer hasarı sonucu meydana gelen hepatik hipoksi, anjiyogenez ve fibrogenezin belirli bir koordinasyon içerisinde olduğunu göstermiştir (7, 61). Devam eden karaciğer hasarı varlığında fibrogenez ve hipoksi birbirini tetikler ve normal doku tamirini bozan patolojik bir döngüye neden olurlar. Böylece siroz gelişimine destek vermiş olurlar. Hipoksi tek başına hepatik hücrelerde VEGF ekspresyonunu ve kolajen I ekspresyonunu arttırmaktadır. Karaciğer vasküler yapısındaki değişiklikler ve anjiyogenez, vasküler rezistans ve portal hipertansiyonu arttırdığı gibi, parankimal perfüzyonu düşürerek, hastalığın sirozla sonlanmasını sağlayacak olan fibrogenez sürecini kolaylaştırır. Hatta hepatik anjiyogenezin; portal sistemik şantları ve iç organdaki kan akışını ayarladığı görülmektedir. Bu durum muhtemelen sirozun komplikasyonlarını etkilemektedir (95). Yapılan çalışmalar; hipoksi, VEGF indüksiyonu ve anjiyogenezin siroz lezyonlarından önce oluştuğunu göstermektedir (61).

Klinik veriler HBV ve HCV infeksiyonlarında anjiyogenez ve fibrogenez arasında iyi bir ilişki olduğunu göstermektedir. Anjiyogeneze hem primer biliyer sirozlu hem de otoimmün hepatitli hastaların biyopsilerinde saptanmıştır. Yine primer biliyer sirozlu bu hastalarda, VEGF, Ang-1, Ang-2, Tie-2 ve endoglin gibi anjiyogenik moleküller karakterizedir (7).

HCC dünyada en sık görülen karaciğer rahatsızlıklarından biridir. Dünya çapında 5. en sık görülen kanser olup, kanserle ilgili ölümlerde 3. sırayı almaktadır. Siroz, etiyolojisi ne olursa olsun HCC için önemli bir risk faktörüdür (50). Hepatik anjiyogenez aynı zamanda HCC 'nin büyümesi ve ilerlemesinde önemli bir faktördür (7). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hipoksik kondisyonların ve hepatik stellat hücrelerin; özellikle profibrogenik fenotip olan miyofibroblastların anjiyogenez ve fibroblast ilişkisini yöneten hücresel ve moleküler mekanizmalardaki önemini vurgulamıştır (7). HCC' de hipoksi, karaciğer fibrogenezi boyunca ekstraselüler matriks kompozisyonunun değişimini direk olarak etkilemektedir (95). HCC cerrahi operasyon ve karaciğer nakli tedavisi ile muhtemel olan bir hastalıktır. Bu bağlamda anjiyogenezin önlenmesi ilerlemiş HCC tedavisi için önemli bir umut olarak görünmektedir (50).

Deneysel çalışmalar anti-anjiyogenik tedavinin hayvan modellerinde kronik karaciğer hastalıklarının sürecini ve ilerlemesini sınırlandırdığını ispat etmiştir (7).

## 2.3. Apoptozis

### 2.3.1. Apoptozis Kavramı

Apoptozis, çok hücreli organizmalarda gelişim sırasında ve gelişimi tamamlanmış organizmaların homeostazında görülen, tipik morfolojik özellikler gösteren, birçok sinyal ve protein tarafından kontrolü sağlanan, fizyolojik ve kontrollü hücre ölümüdür (14-16).

Hücre ölümü kavramı 1920 yılında nekrozun tanımlanması ile ortaya çıkmıştır. Apoptozis ise 1962-1964 yılları arasında ilk defa iskemik karaciğer hasarı çalışmalarında gözlemlenmiştir fakat diğer tip hücre ölümlerinin bir tipi olarak tanımlanmıştır. 1972 yılında Kerr ve arkadaşları sağlıklı dokulardaki hücrelerin yanı sıra atropi, tümör regresyonu ve neoplazi ile ilişkili hücrelerinde ölüme gittiğini gözlemlemiş ve bu olaya "apoptozis" adını vermişlerdir. Apoptozis kelimesi Yunanca kökenli olup ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelir ve programlanmış hücre ölümünün hücresel sürecini tanımlamak için kullanılmıştır (17, 97-99). 1983 yılında ise Duke ve arkadaşları jel elektroforezinde endonükleazların DNA kırıklarına yol açtıklarını saptayarak ilk biyokimyasal kanıtı elde etmişlerdir (100). Memelilerdeki apoptozis mekanizmasının anlaşılması, bir nematod türü olan *Caenorhabditis elegans*' in gelişim sürecinde meydana gelen hücre ölümlerinin incelenmesiyle ortaya çıkmıştır (101).

Apoptozis, multiselüler organizmalarda dokunun homeostazisi ve gelişimi açısından önemli rol oynamaktadır. Apoptozis regülasyonundaki bozukluklar çeşitli hastalıkların gelişimini de beraberinde getirir (102). Apoptozis ve proliferasyon arasındaki kombinasyon gelişen embriyolarda doku ve organların şekillenmesinden sorumludur. Örneğin ayak parmakları arasındaki apoptozis, parmakların birbirlerinden ayrılmasını sağlar (103).

İnsan organizmasında apoptozis birçok fizyolojik ve patolojik durumlarda gözlemlenebilir. Apoptozis, embriyonal ve fetal gelişimde, dokulardaki hücre homeostazisinin sağlanmasında, yaşlılıkta, hücrelerin hasarlanma durumlarında, immün reaksiyonlarda, hormon yetmezliğine bağlı organ gerilemelerinde ve çeşitli viral hastalıklarda meydana gelebilmektedir (14, 104). Apoptozis fetal ve embriyonik gelişim için yaşamsal önem taşımaktadır. Hamilelik esnasında apoptozis ve proliferasyon dengesindeki bozukluklar preeklampsi gibi komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Apoptozisin inhibisyonu kontrol edilemeyen hücre büyümesiyle sonuçlanır ve bu da birçok kanser tipinin meydana gelmesine neden olur. Aşırı apoptozis ise Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumunu tetikler (97, 103).

Isı, hipoksi, antikanser ilaçlar, radyasyon, enfeksiyöz etkenler, genetik bozukluklar, beslenme bozuklukları gibi etkenler hücrelerde DNA hasarı oluşturarak ve hücreyi strese sokarak apoptozisin meydana gelmesine neden olurlar (14, 97, 101).

Apoptozis karaciğerde, karaciğer hasarına karşı oluşan bir selüler cevaptır. Bu cevap iç içe geçen hücresel ve sitokin kaskadlarını başlatır. Bu kaskad doku hasarı, enflamasyon, fibroz ve sonunda da siroz oluşumu ile tamamlanır. Akut ve kronik karaciğer hastalıkları için bu kaskad ve apoptozis olayı büyük önem taşımaktadır. Diğer bütün doku ve organlarda olduğu gibi sağlıklı bir karaciğerde de belli bir seviyede apoptozis olması gerekmektedir. Son çalışmalar karaciğerde apoptozisin fazla olmasının enflamatuvar mediyatörlerin salgılanmasıyla ve fibrozun gelişimiyle direk ilgili olduğunu göstermektedir. Devam eden fazla apoptozisin fibrozu başlattığı bunun da siroz ve karaciğer bozukluklarıyla sonuçlandığı gözlemlenmiştir (17). Apoptozis temelde dört aşamada özetlenebilir (100, 101);

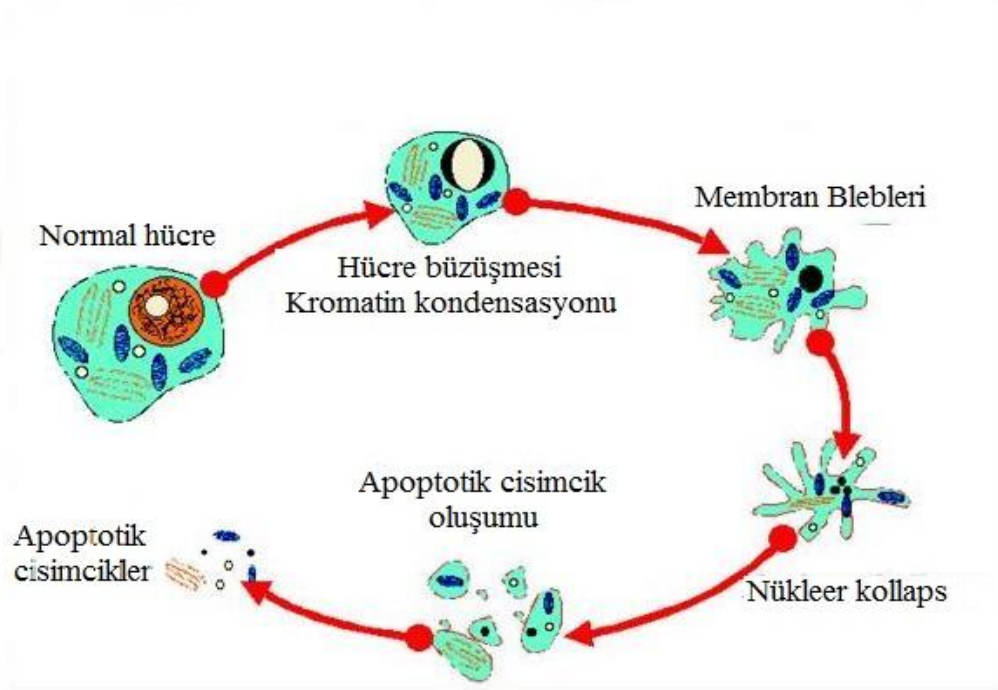
1. Apoptozisin başlaması,
2. Hücre içi proteazlar olan kaspazların aktivasyonu,
3. Hücrenin biyokimyasal ve morfolojik değişime uğraması,
4. Hücrenin makrofajlar veya komşu hücreler tarafından fagosite edilmesidir.

### 2.3.2. Apoptozisin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Kerr ve arkadaşları apoptotik süreçte birçok morfolojik ve biyokimyasal özellik gözlemlemiştir. Bu süreçteki morfolojik değişiklikler şu şekilde özetlenebilir (Şekil 2.9) (97, 105, 106);

- Hücre büzüşmesi,
- Kromatin kondensasyonu ve nükleozomal fragmentasyon,
- Plazma membranında bleblerin (tomurcuklanma) oluşumu,
- Apoptotik cisimciklerin oluşumu,
- Apoptotik cisimciklerin makrofajlar ve komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi.

Apoptozis sürecinde ışık ve elektron mikroskopisinde çeşitli morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Apoptozisin erken evresinde hücrede büzüşme ve çekirdekte yoğunlaşma ışık mikroskobunda görülebilmektedir. Hücrenin büzüşmesiyle sitoplazma sıkılaşır ve organeller daha sıkı paketler haline dönüştürülür. Piknozis; çekirdekteki yoğunlaşma ile kromatin kondensasyonu gerçekleşir ve bu olay apoptozisin en karakteristik özelliğidir (16, 101). Plazma membranında "bleb" denilen tomurcuklanmalar meydana gelir ve bunu karyoreksis; çekirdeğin yapıdan ayrılması izler. Böylece hücre fragmentlere ayrılır ve apoptotik cisimcikler oluşur (Şekil 2.9). Apoptotik cisimcikler, nükleer parçacıkları olan ya da olmayan sıkıca paketlenmiş organellerden ve sitoplazmadan oluşur. Apoptotik cisimcikler makrofajlar veya parankimal hücreler ve neoplastik hücreler gibi komşu hücreler tarafından fagosite edilir (101).



Şekil 2.9. Apoptozis sürecinde hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler (99).

Normalde hücrelerde bulunan prokaspazlar, birçok önemli hücrenel proteini keserek apoptozisde rol alırlar. Bu endonükleazların kesimi ile agaroz jel elektroforezinde "ladder-like pattern" merdiven şeklinde motifler halinde görüntü oluşturan DNA'nın 180-200 baz çifti (bp) büyüklüğündeki fragmentasyonları gözlenir. (16, 107). DNA'nın endonükleazlar tarafından bu kesilmeleri internükleozomal bölgelerden olur ve floresan boyamada DNA boncukları şeklinde gözlemlenir. Apoptozis olayında tamiri mümkün olmayan sayıda kırılmalar meydana gelir. Yaklaşık 300.000 kırılmadan bahsedilebilir (104). Apoptozisteki karakteristik biyokimyasal olaylar şöyle sıralanabilir (16, 105-107);

- Fosfatidil serin translokasyonu,
- Kaspaz aktivasyonu,
- Mitokondriyal permeabilite transisyonu (MPT),
- Sitokrom-c salınımı,
- DNA fragmentasyonu.

Apoptotik hücrelerin plazma membranında oluşan birtakım değişiklikler sayesinde apoptotik hücreler makrofajlar ve komşu hücreler tarafından tanınarak fagosite edilir. Hücre membranının iç tabakasında bulunan fosfatidil serin,

aminofosfolipid transferaz enzimi ile membran dışına göç eder ve fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidil serine bağlanır (98). Makrofajlar ise fosfatidil serine spesifik olarak bağlanan bir glikoprotein olan MFG-E8 (milk fatglobule- EGF-factor 8) salgırlar. Bu protein ölüm hücrelerini tanması açısından makrofajlar için bir belirteçtir (108). Mitokondri membran permeabilitesindeki artış ise proapoptotik proteinlerin salınımına izin verir (97). Bunların yanında ikincil mesajcılar olarak  $Ca^{2+}$ , reaktif oksijen türleri (ROT) ve nitrik oksit (NO) apoptozis için önemli biyokimyasal etkenlerdir (109). Yapılan çalışmalar  $Ca^{2+}$ 'nın sinyal iletim mekanizmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.  $Ca^{2+}$  iyonu bloke edildiği zaman apoptozis olayının meydana gelmediği görülmüştür (110). Seviyesi artırıldığı zaman ise pH'ı düşürerek veya DNA hasarı oluşturarak hücreyi apoptozise yönlendirmektedir (14)

### **2.3.3. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar**

Bilinen diğer bir hücre ölümü şekli nekrozdur. Apoptozis nekrozdaki biyokimyasal, morfolojik ve moleküler özellikler bakımından farklılık gösterir (16). Hücrelerin apoptozisle veya nekroz ile öleceği doku tipine, dokunun gelişim basamaklarına ve fizyolojik ortama göre değişiklik gösterebilir. Nekroz kontrol edilemeyen, enerjiden bağımsız ve geniş hücre alanlarına etki eden bir ölüm şeklidir. Apoptozis ise kontrollü, enerji bağımlı, tek bir hücreye veya hücre kümelerine etki eden bir ölüm şeklidir (101) (Çizelge 2.4). Apoptozisi nekrozdaki ayıran önemli bir özellik de nekrozun komşu hücre gruplarını etkileyen ve enflamasyon oluşturan bir olay olmasıdır (107). Nekrozda bir hücrenin ölümü alarm sinyal moleküllerinin salınımına neden olur. Bu moleküller, makrofajlarda, dentritik hücrelerde ve doğal katil (natural killer NK) hücrelerinde bir veya daha fazla reseptörü stimüle ederler. Nekrotik hücrelerin dokudaki varlığı genellikle immün sistem tarafından bir tehlike olarak yorumlanır ve bu da immün cevabı başlatan bir nedendir. Apoptozisin tersine nekrozda, hücresel şişme, hücrede membran bütünlüğü kaybı, organellerde şişme ve lizozomal sızıntı meydana gelir. DNA' da ise rastgele parçalanmalar olur ve makrofajlar tarafından yutulur (97) (Çizelge 2.4).

**Çizelge 2.4.** Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar (104, 112, 113).

<b>Apoptozis</b>	<b>Nekroz</b>
Hücre büzüşmesi	Hücre şişmesi
Kromatin kondensasyonu	Çekirdekte şişme
Membranda bleb (tomurcuklanma) oluşumu	Hücre membran bütünlüğü kaybı
ATP gereklidir (aktif süreç)	ATP gerektirmez (pasif süreç)
Hücrelerin tek tek veya birkaçının bir arada ölmesi	Hücrelerin gruplar halinde ölmesi
Hem patolojik hem fizyolojik durumlarda meydana gelir	Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir
Enflamasyona neden olmaz	Enflamasyona neden olur
DNA'nın internükleozomal alanlarındaki 180-200 kb lik kırıklarından dolayı agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü	DNA 'da meydana gelen rastgele parçalanmalardan dolayı jel elektroforezinde "smear" görüntü
Apoptotik cisimciklerin makrofajlar ve komşu hücreler tarafından fagosite edilmesi	Hücrelerin parçalanarak içeriklerinin çevreye dağılması; lizis

#### **2.3.4. Apoptozisin Moleküler Mekanizmaları ve Yol İzleri**

Apoptozis olayında hücrenin RNA ve protein sentezi yapıyor olması, sentez inhibisyonu olduğunda ise apoptozis olayının gerçekleşmemesi, apoptozisin gen kontrolünde gerçekleşen bir mekanizma olduğunu kanıtlamaktadır (114).

Araştırmalar apoptozisin mekanizmasında iki temel yol göstermektedir. Bunlar ölüm reseptörleri aracılı “eksternsek yol” ve mitokondri aracılı “intrensek yol” dur. Bu yollar, kaspaz-3’ ün kesimi sonrasında DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin yıkımı, proteinlerin çapraz bağlantısı, apoptotik cisim formasyonu, fagositik hücre reseptörleri için ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesiyle sonlanır (18, 101). Bu yolların dışında bir de “endoplazmik retikulum aracılı yol izi” literatürde yer edinmeye başlamıştır ancak henüz mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu yol izinin hücresel strese cevap olarak meydana geldiği düşünülmektedir (97).

Apoptozis ile karakterize protein yıkımı veya kesilimi kaspazlar adı verilen sistein proteaz ailesinin aktivasyonu ile meydana gelmektedir. Bu yüzden apoptozis mekanizmasını ve yol izlerini anlayabilmek için kaspazların özellikleri ve mekanizmasının iyi anlaşılması gerekmektedir (97).

### 2.3.4.1. Kaspazlar

Kaspazlar, intraselüler sistein proteazlar ailesindedirler ve bütün hayvan hücrelerinde zimojenler olarak bulunurlar. Prokaspazlar, yaklaşık 32-56 kD' durlar ve dört domain içerirler (16). Kaspazların aktivasyonu sırasında zimojen proteinler, aktif enzimlerin ~20 kd ve ~10 kd' luk alt birimlerine bölünürler. Aktif enzimler; iki aktif bölgesinde iki uzun ve iki kısa alt birimlerden oluşan heterotetramerlerden meydana gelir (16, 115). Prokaspazlar üç şekilde aktif hale getirilebilirler (97, 116);

1. Diğer bir aktif kaspaza maruz kalarak,
2. Otokataliz ile,
3. Bir aktivatör protein ilişkisi ile (örn; kaspaz-9, Apaf-1 ve sitokrom-c).

Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahiptirler ve proteinleri aspartat kalıntılarında sonra keserler (115, 117, 118). İnsanlarda ve farelerde tanımlanmış yaklaşık 15 tane kaspaz bulunmaktadır. Kaspazlar aminoasit dizilimlerinin benzerliklerine göre veya proteaz spesifitesine göre gruplandırılırlar. Fonksiyonlarına göre başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olarak gruplandırılabilirler (115, 101).

#### 2.3.4.1.1. Başlatıcı Kaspazlar

Kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 başlatıcı kaspazlar olarak tanımlanır. Başlatıcı kaspazlar, kaspaz aktivitesini başlatan çeşitli proteinlerle etkileşimlerini sağlayacak uzun N-terminal prodomainlere sahiptirler (115). Başlatıcı kaspazlar apoptozisin başlangıç safhasında proapoptotik sinyaller tarafından aktive edilirler. Prodomainlerinde, adaptör molekülle etkileşimlerini sağlayacak bir veya iki modül içerirler. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 için bu bölge DED olarak tanımlanırken, kaspaz-9 için CARD olarak tanımlanmıştır. Her iki yolak için de DED ve CARD majör rota olarak kullanılmaktadır (119). Kaspazların spesifik etkileşimi ve aktivatör protein, multimerik kompleks oluşumunu destekler. Bu da iki kaspaz prokürsörünün bir araya gelmesini, birbirini aktive etmesini ve bir aktif tetramer oluşumunu gerektirir (97, 118).

Apoptoziste önemli bir rol üstlenen ve FLICE olarak da bilinen kaspaz-8, insan kromozomunda 2q33-34 bölgesinde iki band halinde bulunmaktadır (120). Kaspaz-8 ve kaspaz -3, aktif bölgelerinde sisteinin yer alması bakımından birbirlerine benzerlik gösterirken, kaspaz-8' in DED bölgesini içeren N-terminal uzunluğu iki kaspazı birbirinden ayırır (122). Programlanmış hücre ölümünde kaspaz-8 in ekspresyon miktarı

da hangi sinyal yolağının başlatılacağını belirleyebilmektedir. Aktif kaspaz-8 ekspresyonunun miktarına bağlı olarak iki farklı sinyal yolağı başlatılabilir. Düşük miktarda kaspaz-8 eksprese edilmiş Fas aracılı birinci yolakta, proapoptotik Bid kesilir, bunu takiben sitokrom-c mitokondriden sitozole salınır ve sonra da hücre ölümü gerçekleşir. Yüksek miktarda kaspaz-8 eksprese edilmiş ikinci yolakta ise, mitokondri atlanır ve kaspaz-3 aktive edilir. Efektör kaspazlar aktif kaspaz-8 tarafından kesilir. Aktif hale gelen efektör kaspaz-3, fodrin, gelsolin, nükleer laminler ve ICAD gibi sitoskeletal proteinleri degradasyona uğratar (123). Kaspaz-8 aynı zamanda Bcl-2' nin homoloğu olan Bid' i keserek aktif tBid oluşumunu sağlar. Aktif tBid daha sonra mitokondri dış membranında Bcl-2 ile kompleks oluşturarak Bcl-2' yi inhibe eder ve mitokondriyal ölümü başlatır (117, 124).

Kaspaz-9 apoptoziste rol alan diğer bir başlatıcı kaspazdır. İnsan kromozomunun 1p36.1-p36.3 bölgesinde lokalize olmuştur ve diğer kaspazlardan farklı olarak aktif bölgesinde pentapeptit bulundurur. Uzun bir N-terminal bölgeye sahip olması bakımından Ced-3 ve kaspaz-2 ile benzerlik göstermektedir (125). Apoptozisin intrinsek yolağında, membran permeabilitesinin ihlali ile mitokondriden sitozole sitokrom-c salınımı gerçekleşir. Sitokrom-c, apoptozis aktive eden faktör-1 (Apaf-1) ile bir kombin oluşturur. Oluşan yapı kaspaz-9 u aktive etmek için bu proteinle bir kompleks oluşturur. Yeni oluşan bu üçlü forma “apoptozom” adı verilir. Aktif hale gelmiş olan kaspaz-9, kaspaz-3 ü aktive ederek kaspaz kaskadını ve apoptozisi başlatmış olur (97).

#### **2.3.4.1.2. Efektör Kaspazlar**

Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 efektör kaspazlar grubundandır. Efektör kaspazlar, başlatıcı kaspazların tersine kısa N-terminal prodomainler içerirler. Efektör kaspazlar genellikle başlatıcı kaspazların proteolitik sürecine ve aktivasyonuna bağlıdırlar (115). Efektör kaspazlar aktive oldukları zaman aspartat kalıntılarını takiben hedef proteinleri seçerek keserler. Çoğu zaman bu olay hedef proteinin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca efektör kaspazlar, direkt olarak negatif regülatör domaini keserek veya indirekt olarak regülatör alt birimi inaktif hale getirerek proteinleri aktive edebilirler. Efektör kaspazlar hücre iskeletinde filament agregasyonuna (topaklanmasına), ribozomal parçacıkların kümeleşmesine ve granüllü endoplazmik

retikulumun elektron mikroskopunda sarmal diziler şeklinde görünmesini sağlayan düzenlenmelerine neden olurlar (97, 116).

Efektör kaspazlardan olan ve apoptozis olayında önemli bir rol üstlenen kaspaz-3, CPP32, Yama ve apopain olarak da adlandırılmaktadır. Kaspaz-3, insan kromozomunun 4q33-q35.1 bölgesinde bulunur ve yaklaşık 32 kDa ağırlığında bir sistein proteazdır (126).

PARP (ADP-riboz) adlı enzim DNA onarımından sorumlu bir enzimdir ve kaspazlar için tanımlanmış bir substrattır. Kaspaz-3, DNA hasarında PARP enzimini keserek onarım kabiliyetini engeller ve hücreyi apoptozise sürükler (103).

Efektör kaspazlar DNA fragmentasyonunu sağlayan “kaspaz aktive edici DNaz” (CAD) proteinini de aktive ederler. CAD, CAD inhibitörü (ICAD) olarak inaktif formda bir alt birime bağlı halde nükleusta bulunur. Efektör kaspaz-3 aktive olduktan sonra nükleusa doğru göç ederek inhibitör alt birimi keser ve aktif CAD oluşmuş olur. CAD, DNA fragmentasyonundan sorumludur ve DNA’ yı 50-300 kb’ lık parçalar halinde keser. Daha sonra bu parçalar endonükleazlar tarafından 180-200 bp’ lik parçalara bölünür ve bu da apoptozisin en önemli özelliklerinden olan, agaroz jel elektroforezinde merdiven şeklinde görüntünün oluşumunu sağlar (103, 111).

#### **2.3.4.2. Kaspaz Regülatörleri**

Apoptozis sırasında sitokrom-c, Smac/DIABLO, serin proteaz Htr A2/Omi, AIF, endonükleaz G ve CAD proteinleri mitokondriden dışarıya salınırlar. Smac/DIABLO ve Htr A2/Omi IAP proteinlerinin aktivitesini inhibe ederek apoptozisi desteklemektedir (101,103). Aynı zamanda bu olay efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır (127).

AIF, ~50-~300 kb’ lik DNA fragmentasyonunu ve kaspaz bağımsız kromatin kondensasyonunu sağlar. Endonükleaz G de aynı şekilde nükleusa transloke olarak nükleer kromatini keser ve kaspaz bağımsız DNA fragmentlerini oluşturur (128).

Apoptozis inhibitörleri (IAP) protein ailesi, apoptozisin moleküler mekanizmasının önemli regülatörleri olarak tanımlanmıştır. Yapısal olarak en önemli özellikleri 1-3 N-terminal bölgelerinde 70-80 amino asitlik bir bölgede Baculovirüs IAP tekrarları (BIR) bulundurmaları ve C terminal bölgelerinde korunmuş bir RING Zn bölgesi bulundurmalarıdır. Bu bölgelerin varlığı antiapoptotik fonksiyonları için önemlidir. Günümüze kadar 7 tane insan IAP homologu tanımlanmıştır; NAIP, cIAP1,

cIAP2, XIAP, survivin, apollon ve livin (129, 130). İnsan IAP ailesi üyelerinden XIAP, cIAP1 ve cIAP2, efektör kaspazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7' yi ve başlatıcı kaspaz-9' u inhibe etmektedir (115).

NFκB immün sistem, inflamasyon ve antiapoptotik gen regülasyonunda görev alan bir faktördür (131). IAP bir mediyatör ve regülatör olarak NFκB' nin apoptotik aktivitesini kontrol etmektedir (129).

Doğal katil hücrelerinin ve T hücrelerinin perforin ve granzim salarak hedef hücreyi apoptozise sürükleyen bir mekanizma bulunmaktadır. Perforin ve granzim serin proteazlardır ve perforin hedef hücre membranında porlar açma yeteneğine sahiptir. Perforinlerin açtığı deliklerden granzimler içeriye salınır ve kaspaz-3' ü aktive ederek Bid aracılı sitokrom-c salınımını sağlar. Granzim B en önemli granzimdir (132).

#### **2.3.4.3. Bcl-2 Ailesi**

Mitokondriyal apoptotik olayların kontrolü ve regülasyonu Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından sağlanmaktadır (115). Bcl-2 ailesi fonksiyonel ve yapısal benzerlikleri açısından 3 gruba ayrılmıştır; Grup II ve Grup III apoptozisi desteklerken, Grup I, antiapoptotik aktiviteye sahiptir.

Grup I antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri olarak Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1 gösterilmektedir. Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub>' nin ADP/ATP değişimini stimüle ederek, mitokondrinin iç transmembran potansiyelini stabilize ederek ve transfer por permeabilitesinin oluşumunu engelleyerek mitokondri permeabilitesini kontrol ettiği düşünülmektedir. Bu proteinlerin aynı zamanda proapoptotik proteinler olan Bax ve Bak' ın da inhibisyonunu sağladığı düşünülmektedir (97, 101, 115). Bcl-2' nin hücrede kalsiyum homeostazında rol aldığı da görülmektedir (131).

Grup II üyeleri Bax, Bak ve Bok/Mtd' dir ve proapoptotik özellik gösterirler. Bcl-2 ailesinin üyelerinin bu şekilde birbirinden farklı özellik göstermelerinin sebebi yapılarındaki BH1, BH2, BH3 ve BH4 bölgelerinin bulunmasıdır. Bu bölgeler onların hidrofobik cebidir ve bu cep sayesinde diğer bir Bcl-2 ailesi üyesine bağlanabilirler. Grup II üyeleri BH4 hariç diğer bölgeleri içerirler (113, 115, 131). Başta Bax ve Bak olmak üzere bu grup üyelerinin mitokondriden sitokrom-c salınımını sağlayan porları oluşturdukları düşünülmektedir. Bu proapoptotik üyelerin hücrel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü yoksunluğu ile meydana geldiği bilinmektedir (103, 118).

Grup III üyeleri Bid, Bak, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa, PUMA ve Bcl-G' dir. Yapılarında sadece BH3 bölgesi içerirler ve proapoptotik özellik gösterirler (115).

Bcl-2 ailesinin proapoptotik proteinleri, Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub>' nin antiapoptotik aktivitesini onların mitokondriye bağlanma bölgelerine bağlanarak engelleyebilirler. Aynı proapoptotik proteinler Bax ve Bak aktivitesini başlatarak apoptozise neden olurlar. Proapoptotik aktivitenin 3. tipi ise sitoplazmik bir protein olan Bid sayesinde gerçekleşir. Kaspaz-8 tarafından aktive edilen Bid, Bax' da konformasyonel bir değişikliğe neden olarak Bax' ın mitokondriden içeriye transloke olmasını sağlarlar (97, 117).

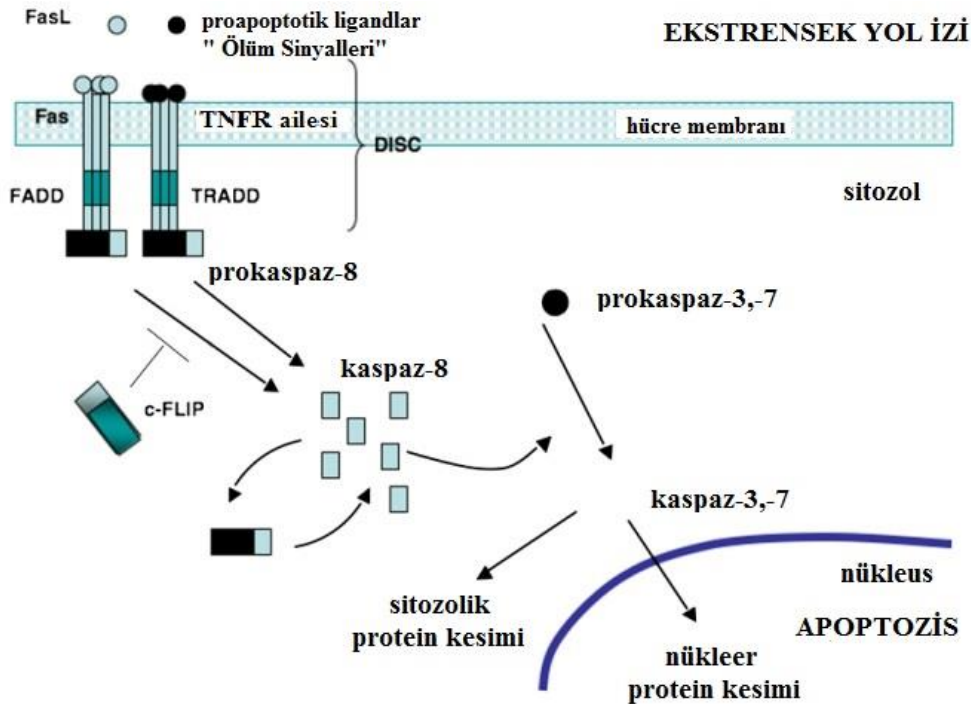
**P53**; bir transkripsiyon faktördür. P53, intrinsek yol izini indükleyerek, bir hücre stres sensör molekülü olarak hücre döngüsünü ve işlevini düzenler. İyonizan radyasyon, genotoksik ilaçlar ve serbest radikaller gibi DNA hasarına neden olan faktörler P53' ü aktive eder. Aktive edilmiş P53 öncelikle Bcl-2 gibi antiapoptotik faktörlerin transkripsiyonunu bastırarak veya bir proapoptotik faktör olan Bax üretimini indükleyerek apoptozisi destekler. Bcl-x<sub>L</sub> ise P53' ü inhibe edebilmektedir (97, 101).

#### **2.3.4.4. İntrensek (Mitokondri Aracılı) Yol İzi**

İntrensek yol izi, DNA hasarı, oksidatif stres, radyasyon, hormon veya büyüme faktörü yoksunluğu, kemoterapik etkenler, sitokinler ve glukokortikoidler gibi hücrel strese neden olan etkenlere cevap olarak başlatılır (113). İntrensek yolak, çeşitli sinyaller aracılığı ile mitokondride açılan mitokondrial geçirgenlik deliklerinden (MPT) proapoptotik proteinlerin sitozole salınmasıyla karakterize bir yoldur. Bu proteinlerin başında ise sitokrom-c gelir ve kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive ederler. Sitokrom-c mitokondriden sitozole salındıktan sonra Apaf-1' e bağlanır. Daha sonra yapıya kaspaz-9 katılır ve 700 kDa büyüklüğünde "apoptozom" adı verilen molekül oluşur (Şekil 2.10) (117, 134). ATP varlığında bu olay kaspaz-9 da konformasyonel değişime neden olur ve kaspaz-9 un aktif olmasını sağlar. Mitokondriden salınan diğer bir önemli protein Smac/DIABLO' dur. Smac/DIABLO, apoptozis inhibitörü IAP' ı inaktif hale getirerek apoptozisi indükler (119, 127). İntrensek yolağın apoptozisi indüklemeye konusundaki başarısı B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) süper ailesinin proteinlerinden olan proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin arasındaki hassas



şunlardır; FasL-FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L-DR3, Apo2L-DR4, Apo2L-DR5 ( 117, 119). Bu reseptörlerden en fazla bilinen iki üye Fas reseptörü ve TNFR1' dir. Bu reseptörlerin ligandları olan FasL, T hücreleri ve doğal katil hücreler tarafından eksprese edilirken, TNF $\alpha$ , aktive monosit/makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilir. Ölüm reseptörleri ve ligandları birleşerek bir kompleks oluştururlar. Oluşan bu komplekse bağlanacak adaptör protein için bir bağlanma bölgesi oluşturulur. Adaptör protein her bir reseptör için özgüldür. Fas için Fas ilişkili ölüm bölgesi (FADD), TNFR için TNF reseptör ilişkili ölüm bölgesi (TRADD)' dır. Fas ilişkili ölüm yolağında oluşan bu reseptör-ligand-adaptör protein kompleksi, ölüm indüklü sinyal kompleksi olarak (DISC) adlandırılır. DISC, başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8' in otoproteolitik aktivasyonunu sağlar. Kaspaz-8 aktivasyonu ile apoptozis fazı başlatılmış olur (Şekil 2.11) (117, 132, 138). Ölüm reseptörü aracılı apoptozis, c-FLIP adı verilen ve FADD ile kaspaz-8' e bağlanarak onları inaktif hale getiren bir protein ile inhibe edilebilir (118). TNFR1 ilişkili ölüm yolağında ise adaptör olarak TRADD kullanılır. TRADD, FADD' ı aktive eder ve aynı şekilde kaspaz-8 aktive edilerek kaspaz kaskadı başlatılır (Şekil 2.11). Ancak bu yolda farklı olarak TRADD, NF $\kappa$ B' yi aktive eder. NF $\kappa$ B antiapoptotik etkilere sahiptir ve Fas aracılı apoptozise etki etmemektedir (103, 132).



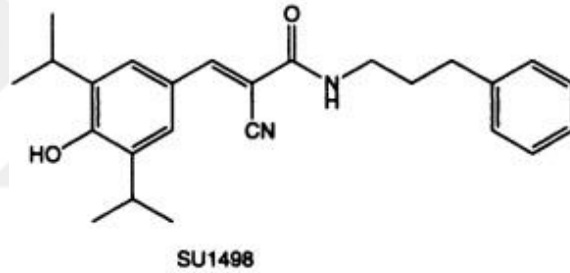
Şekil 2.11. Apoptoziste ekstrinsek yol izi (97).

FasL damarlarda bir bariyer olarak da rol alabilmektedir. Vasküler endotelial hücrelerde ciddi bir ekspresyonu söz konusudur ve bu ekspresyonun inflamasyon olmayan dokulara lökosit sızıntısını engellediği düşünülmektedir (139).

#### 2.4. SU-1498

Kimyasal formülü [(E)-3-(3,5-Diizopropil-4-hidroksifenil)-2-[(3-fenil-n-propil) aminokarbonil] akrilonitril] olan SU 1498, VEGFR-2 için spesifik inhibitördür. Moleküler formülü  $C_{25}H_{30}N_2O_2$  olup; moleküler ağırlığı 390,52 g/mol' dür (Şekil 2.12).

VEGFR-2, fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde VEGF için yüksek afinite gösteren bir inhibitördür. Son yıllarda kanser ve diğer birçok hastalığın tedavisi için VEGFR' ünü inhibe eden ilaçlar üzerinde durulmaktadır. Bu ümit verici moleküllerden biri de SU 1498' dir (19, 20).



Şekil 2.12. SU 1498; [(E)-3-(3,5-Diizopropil-4-hidroksifenil)-2-[(3-fenil-n-propil) aminokarbonil] akrilonitril] (20)

#### 2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller genellikle kararsız ve yüksek reaktif, son yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran ve hücre metabolizmasında çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemde oksijen ve nitrojen temelli olmak üzere iki çeşit serbest radikal bulunur. ROT oksijen metabolizması sürecinde üretilir ve oksijen temelli serbest radikallerdir. (140, 141). ROT çevre kirliliği ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerin etkisiyle ve normal selüler metabolizmanın bir sonucu olarak üretilmektedir. Karbonhidratlar, nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi hücrenin yapısal elemanlarını hasara uğrattıkları ve

onların fonksiyonlarını değiştirirler. Antioksidan sistem; ROT' un zarar verici etkilerini bloke eden enzimatik ve nonenzimatik moleküllerden oluşur (140, 142, 143).

Oksidatif stres, serbest radikallerin artışı ile oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır ve karaciğer hastalıklarında, diğer kronik ve dejeneratif hastalıklarda da önemli rol oynar (140, 141).

Oksidatif stres durumunda oluşan reaktif metabolitler, vücudun savunma mekanizması tarafından nötralize edilirler. Savunma sisteminin temel elemanları endojen ve eksojen antioksidanlardır. Endojen antioksidanlar; SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-P<sub>x</sub>) gibi enzimatik ve bilirubin, seroplazmin, redükte glutatyon (GSH) albümin, ürik asit gibi nonenzimatik üyelerden oluşmaktadır. Vitamin C (askorbik asit), vitamin E (alfa tokoferol), beta karoten gibi vitaminler eksojen antioksidanlardır (144, 145).

GSH, antioksidan etkilerini birçok farklı yoldan gösterebilir. Hidrojen peroksit ve lipit peroksit detoksifikasyonunu GSH-P<sub>x</sub> yoluyla gerçekleştirir. GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' yi H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>' ye indirgemek için elektronlarını verir ve bu tepkimede GSH okside glutatyona (GSSG) çevrilir. Daha sonra tekrar GSSG, NAD(P)H' 1 elektron donörü olarak kullanan GSH redüktaz ile GSH' a indirgenir. GSH-P<sub>x</sub>' ler ayrıca, hücre membranının lipit peroksidasyondan korunması açısından önemlidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz ve GSH-P<sub>x</sub> tarafından suya indirgenir (140).

Mitokondriden sitokrom-c salınımı ile birlikte kaspaz aktivasyonunun ve apoptozisin başlatılması ROT varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Lipit peroksitler ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi oksidanlara maruz kalan hücrelerde apoptozisin artması bunu desteklemektedir. Apoptozisi önleyen antioksidanlara GSH, katalaz, SOD, GSH-P<sub>x</sub> gibi enzimatik endojen antioksidanlar örnek verilebilir (146, 147).

Karaciğer hasarında, oksidatif strese tabi olan birincil hücreler parankimal hücrelerdir. Kupfer hücreleri, hepatik stellat hücreleri ve endotelial hücreler potansiyel olarak oksidatif strese daha duyarlıdır. Oksidatif stresin neden olduğu lipit peroksidasyon tarafından, hepatik stellat hücrelerin proliferasyonu ve kolajen sentezi başlatılır (141). Nitrik oksit (NO) bir serbest oksijen radikalidir ve karaciğer yetmezliğinde önemli bir rol oynamaktadır (143).

Günümüzde çeşitli antioksidanların, karaciğer hastalıklarını önleyebileceği ve tedavisine katkıda bulunabileceği ileri sürülmektedir (141).

## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. Gereçler

#### 3.1.1. Cihazlar

1. Plate Okuma Cihazı (ELX800, Biotek, Tükiye)
2. Spektrofotometre (Analytikjena-SPECORD 50)
3. Su Banyosu (GFL-Wasserbad Water Bath)
4. Vorteks (Heidolph)
5. Hassas Terazı (Metler Toledo)
6. Mikropipet Seti (Gilson- Pipetman- P20-P100-P-1000)
7. Homojenizatör (Ultra)
8. Etüv (Binder)
9. pH Metre (Metler Toledo)
10. Soğutmalı Santrifüj (Sigma, 2-16K)
11. Distile Su Cihazı (Millipore)
12. Derin Dondurucu (Regal, RDD 1145)
13. Santrifüj (Sigma 16K)
14. Manyetik Karıştırıcı (Vert)
15. 8'li strip tüp
16. 8 kanallı pipet
17. Bioer Thermal Cycler (BIOER Technology)
18. ThermoPikoReal 96 Real-Time PCR System (ThermoScientific)

### 3.1.2. Sarf Malzemesi ve Kimyasal Maddeler

1. Folin ciocalteu (Sigma)
2. n-Butanol (Merck)
3. Asetik asit (Sigma)
4. Tiyobarbitürikasit (TBA) (Sigma)
5. Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
6. 1, 1, 3, 3-tetrametoksipropan (Sigma)
7. 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit](DTNB) (Sigma)
8. N-nitrozodietilamin (DEN) (Sigma)
9. Ependorf tüpü
10. SU 1498; [(E)-3-(3,5-Diisopropyl-4-hydroxyphenyl)-2-[(3-phenyl-n-propyl) aminocarbonyl] acrylonitrile].
11. Kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyon kiti
12. VEGFR-2 gen ekspresyon kiti
13. RNA İzolasyon kiti (mirVana™ PARIS™ Kit, Katalog No: AM1556, Ambion RNA by Life Technologies)
14. cDNA kiti ( miScript Reverse Transcription Kit, Katalog No: 218061, Qiagen )
15. Preamplifikasyon kiti (Taqman PreAmp Master Mix, Katalog No: 4391128, Applied Biosystems)
16. Eksonükleaz reaktifleri (Exonuclease I ve Exonuclease I buffer, Katalog No: #MO293L, Biolabs)
17. PCR karışımının hazırlanmasında kullanılan reaktifler (Fast EvaGreen qPCR Master Mix, Katalog No: 31003-1, Biotium)
18. Primer ve örnek sulandırmada kullanılan sıvılar (DNA Suspension Buffer, Katalog No: TO223, Teknova, PCR Certified Water, Katalog No: W3340, Teknova).
19. 2-merkaptotanol (Sigma)

### 3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Temini

Bu çalışmada MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Üretim Birimi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 225-250 g olan, 56 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçanları kullanıldı. Bu çalışma M.E.Ü Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurulu' nun 15/06/2011 tarihli 2011/18 sayılı etik kurul kararı alındıktan sonra başlatıldı.

Deney hayvanları toplam 6 kafeste muhafaza edildi. Sıçanlar deneysel çalışmalar süresince (13-22 hafta) sıcaklığı ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ve nemi ( $\% 55 \pm 8$ ) sabit tutulan odalarda muhafaza edildi. Havalandırma pencere tipi aspiratörle sağlanırken, odanın aydınlık-karanlık döngüsü otomatik denetleyici bir aygıt ile 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar, temizliği düzenli olarak sağlanan plastik kafeslerde tutuldu ve beslenmeleri için hazır standart yem; su gereksinimleri için ise özel uygulamalar hariç, diğer sıçanlara çeşme suyu verildi.

### 3.3. Çalışma Grupları

Bu çalışmada Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) ( $250\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hafta}$ ), Siroz+SU 1498 (II) ( $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hafta}$ ), Siroz sonrasında+SU 1498 (III) ( $300\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hafta}$ ) olmak üzere 6 grup oluşturuldu. Daha önceki çalışmalarda elde edilen veriler ışığında siroz oluşumunun 10-12. haftada oluştuğu tespit edildiğinden 10. haftadan itibaren siroz oluşumunun takibi başlatıldı ve 10. haftanın sonunda siroz grubundan rastgele seçilen 1 sıçan sakrifiye edildi. 10. haftada sakrifiye edilen sıçanda siroz bulguları tam olarak gözlenemediğinden 3 hafta daha çalışmaya devam edildi. 13. hafta sonunda siroz grubundan rastgele seçilen 1 sıçan daha sakrifiye edilerek siroz oluşumunun varlığı histopatolojik incelemeler sonucu kanıtlandı.

Deneysel çalışma protokolü tamamlanan tüm gruplarda ki sıçanlar anestezi madde (ketamin + xylazin) verilmek suretiyle, servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi ve hızlı bir şekilde dokuları diseke edildi.

**Kontrol Grubu:** Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi ve beslenmeleri için hazır standart yem; su gereksinimleri için ise çeşme suyu verildi. 13 haftalık süre sonunda kontrol grubundaki sıçanlar öldürüldü.

**Siroz Grubu:** Çalışma grubuna 11 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN ilave edilen su, 13 hafta süresince içme suyu olarak verildi. 10. haftadan itibaren siroz oluşumunun takibi başlatıldı ve 10. haftanın sonunda rastgele seçilen 1 sıçan sakrifiye edildi. 10. haftada sakrifiye edilen sıçanda siroz bulguları tam olarak gözlenemediği için 3 hafta daha çalışmaya devam edildi. 13. hafta sonunda siroz grubundan rastgele seçilen 1 sıçan daha sakrifiye edilerek histopatolojik incelemeler

sonucu siroz oluşumunun varlığı kanıtlandı. Bu teyitin ardından 13. haftanın sonunda bu gruptaki sıçanlar öldürüldü.

**DMSO Grubu:** Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi ve son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte DMSO maddesi intraperitoneal olarak verildi. SU 1498' in DMSO' da çözülerek hazırlanmasından dolayı çalışmalarda DMSO' dan gelebilecek etkiyi dışlamak amacı ile 13 hafta boyunca DMSO uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. haftanın sonunda öldürüldü.

**Siroz+SU-1498 (I) (250 µg/kg/hafta) Grubu:** Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. VEGFR-2 reseptör inhibitörü olan SU 1498' in siroz oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 250 µg/kg/hafta olacak şekilde 13 hafta boyunca intraperitoneal olarak SU 1498 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. hafta sonunda öldürüldü.

**Siroz+SU-1498 (II) (500 µg/kg/hafta) Grubu:** Çalışma grubuna 8 adet sıçan dahil edildi. VEGFR-2 inhibitörü; SU 1498' in siroz oluşumu üzerindeki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu ile birlikte 500 µg/kg/hafta olacak şekilde 13 hafta boyunca intraperitoneal olarak SU 1498 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlar 13. hafta sonunda öldürüldü.

**Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300 µg/kg/hafta) Grubu:** Çalışma grubuna 7 adet sıçan dahil edildi. VEGFR-2 inhibitörü; SU 1498' in siroz oluştuktan sonraki etkilerini gözlemek amacıyla bu gruptaki sıçanlara ilk olarak son derişimi 100 ppm olacak şekilde DEN içeren içme suyu 13 hafta boyunca verildi. Daha sonra 8 hafta boyunca 300 µg/kg/hafta olacak şekilde intraperitoneal olarak SU 1498 uygulaması yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan 5 tanesi öldü. Bu grup için yeniden 6 adet sıçan temin edildi ve deneyin tekrarı birebir uygulandı. Sonradan alınan sıçanlardan da 2 tanesi öldü. Toplamda geriye kalan 6 sıçan 21. haftanın sonunda öldürüldü.

### **3.4. Çalışma Örneklerinin Hazırlanışı**

#### **3.4.1. Doku Örnekleri**

Deneysel çalışma sonrasında çalışma planına göre sakrifiye edilen sıçanların karaciğerleri diseke edildi. Karaciğerlerden alınan örneklerin bir kısmı histopatolojik incelemeler yapılmak üzere %10'luk formaldehit içerisinde Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı patoloji laboratuvarına gönderildi. Kalan karaciğer dokusunun bir bölümünden total RNA izolasyonu yapıldı bir kısmı ise diğer biyokimyasal analizler yapılncaya kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edildi.

### **3.5. Analiz Yöntemleri**

#### **3.5.1. Biyokimyasal Analizler**

##### **3.5.1.1. Apoptozis ve Anjiyogenez Belirteçlerinin İncelenmesi**

###### **3.5.1.1.1. Kaspaz-3, 8, 9 ve VEGFR-2 Gen Ekspresyon Ölçüm Yöntemi**

Total RNA izolasyonu; dokudan mirVana™ PARIS™ Kit (Ambion, California, USA) izolasyon kiti ile yapıldı. İzole edilen total RNA' lar Reverse Transcription kit (Qiagen, USA) protokolü uygulanarak cDNA' ya dönüştürüldü ve cDNA' lar analiz gününe kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklandı. Daha sonra miRNA TaqMan PreAmplifikasyon protokolü uygulanarak preamp cDNA' lar elde edildi. PreAmp cDNA' lardan aynı gün kullanılmayanlar  $-20^{\circ}\text{C}$  de aynı gün kullanılacak olanlar  $+4^{\circ}\text{C}$  de saklandı. Son olarak Dynamic Array Gen Ekspresyon Protokolü gereğince Load ve Mix işlemleri tamamlanarak BioMark Data Collection software yazılımı eşliğinde GE 96.96 PCR+Melt v1 thermal protokolü uygulanarak elde edilen sonuçlar bilgisayara kaydedildi. House keeping (kontrol gen) gen olarak Gliseraldehid 3-Fosfat

Dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Analiz yönteminde; elde edilen RT-PCR sonuçlarının (Ct değerlerinin) analizlerini  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ile hesaplandı.

### 3.5.1.2. Antioksidan Kapasitenin İncelenmesi

#### 3.5.1.2.1. Doku GSH Ölçümü

**Prensip:** GSH sülfidril grubu içeren bir bileşiktir. Bir disülfid bileşiği olan 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoyik asit] (DTNB), sülfidril grupları tarafından redüklenirler. Redüksiyon sonucu oluşan sarı renkli kompleksin 412 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri GSH miktarını göstermektedir (148).

#### Ayırıcılar:

1. Çöktürücü Çözelti
2. 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
3. % 0,04 DTNB Çözeltisi

#### Yöntem

Kör ve örneğe ait deney tüpleri aşağıda verilen şekilde hazırlandı.

	Kör (mL)	Örnek (mL)
Doku homojenatı	-	2
Saf su	2	-
Çöktürücü	3	3
<b>Karışım 5 dakika bekletildi, örnek filtre kağıdından süzüldü.</b>		
Süzüntü	2	2
0,3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8	8

**Örneğin absorbans değeri 412 nm'de köre karşı ölçüldü (OD1). Tüplere**

%0,04 DTNB	1	1
------------	---	---

ilave edildi ve örnek tüpte oluşan renk 412 nm’de köre karşı ölçüldü (OD2).

### Hesaplama

Glutasyon derişimi  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak hesaplandı.

$$\frac{C (\mu\text{mol}/\text{mL})}{1000} = \frac{(OD2-OD1)}{13,600} \times \frac{5}{2}$$

$$C (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (OD2-OD1) \times 0,184$$

$$\mu\text{mol}/\text{mg protein} = \frac{C (\mu\text{mol}/\text{mL})}{\text{Protein (mg / mL)}}$$

13,600: GSH ile DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı

C:  $\mu\text{mol} / \text{mL}$  Glutasyon

OD1: DTNB ilave edilmeden önce 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

OD2: DTNB ilave edildikten sonra 412 dalga boyunda ölçülen optik dansite

1000 :  $\mu\text{mol}^{\circ}$  e dönüşüm katsayısı

5/2: seyreltme katsayısı

### 3.5.1.2.2. Doku MDA Ölçümü

**Prensip:** MDA, aerobik şartlarda pH 3,4’ te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C’ de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin 532 nm dalga boyundaki absorbans değerinin ölçümü esasına dayanmaktadır (149).

### Ayırıcılar

1. % 8,1’ lik SDS

2. % 20’ lik Asetik Asit

3. % 0,8' lik Tiyobarbitürük asit (TBA)
4. n-Butanol / Piridin (nBu/Pri) Çözeltisi (15/1)
5. Stok Standart (1,1,3,3-tetrametoksipropan)

### Yöntem

Çalışma için gerekli olan ayıraçlar aşağıda tabloda belirtildiği şekilde tüplere konuldu.

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
Doku homojenatı (mL)	-	-	0,1
Standart (mL)	-	0,1	-
SDS (mL)	0,2	0,2	0,2
Asetik Asit (mL)	1,5	1,5	1,5
TBA (mL)	1,5	1,5	1,5
Saf Su (mL)	0,8	0,7	0,7

**95 °C'de 30 dakika inkübe edilir ve tüpler çeşmenin altında soğutulur.**

Saf Su (mL)	1,0	1,0	1,0
nBu / pri	5,0	5,0	5,0

Tüplere konulan çözeltiler vortekslelendikten sonra 4000 g' de 10 dakika santrifüj edildi, üstteki organik kısım alınarak 532 nm' de absorbans değeri okundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak değerlendirildi.

$$\text{MDA (nmol/mg protein)} = \frac{\text{nmol / mL}}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

### 3.5.1.3. Lowry Yöntemi ile Protein Tayini

**Prencip:** Alkali ortamda proteinlerin fosfotungstik asit ve bakır sülfat ile reaksiyona girerek mavi renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 550 nm dalga boyunda absorbans değerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır (150).

### Ayıraçlar

1. % 2 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
2. % 1 (w/v) CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O
3. % 2 (w/v) Na-K tartarat
4. Folin-Ciocalteu Ayıracı
5. Standart (Bovin Serum Albumin)

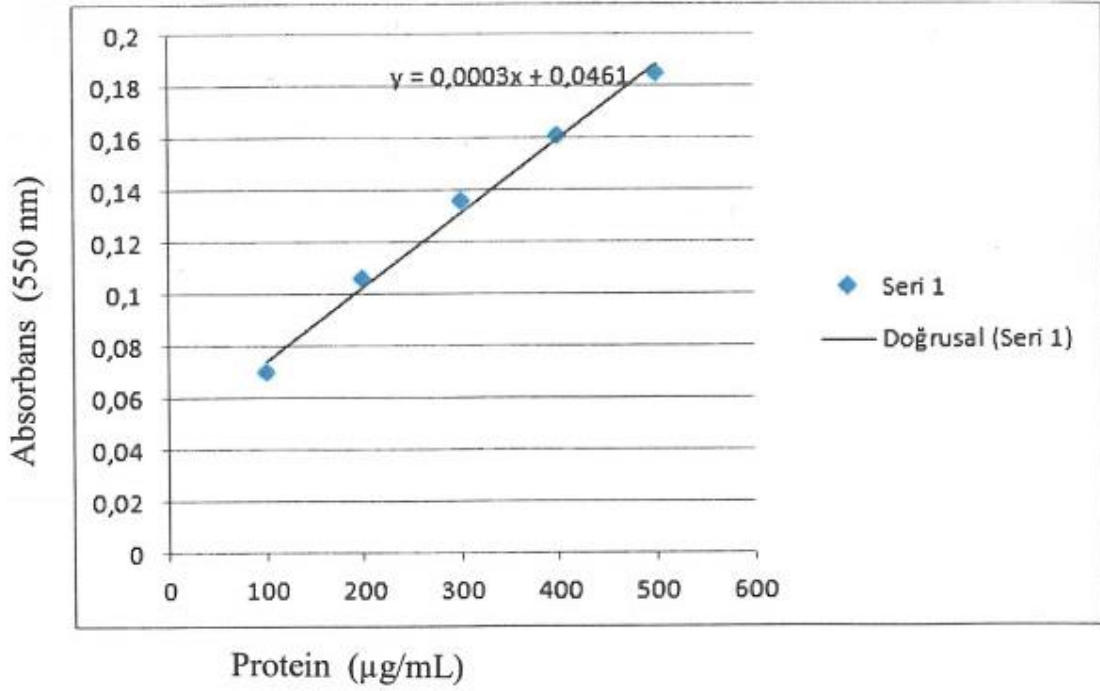
Günlük çözelti (Ayıraç C): 50 mL %2 (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 mL %1 (w/v)

CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O ve 0,5 mL %2 (w/v) Na-K tartarat ilave edilerek hazırlandı.

### Protein Standart Eğri Çizimi:

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
BSA Standart Derişim (µg/mL)	-	100	200	300	400	500
İlgili BSA Standart çözeltisi (mL)	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Serum Fizyolojik (mL)	0,3	-	-	-	-	-
Ayıraç C (mL)	3	3	3	3	3	3
<b>Karışımlar hazırlanıp oda ısısında 10 dk bekletildi.</b>						
Folin-ciocalteu (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Tüplere ilave edildi ve 30 dk oda ısısında bekletildi. 550 nm' de köre karşı absorbans değerleri okundu. Protein standart eğrisi çizildi.



## Yöntem

Çözeltiler tüplere aşağıdaki şekilde konuldu.

	Kör	Örnek
Saf su (mL)	0,3	-
Doku homojenatı (mL)	-	0,3
Günlük çözelti (mL)	3,0	3,0
<b>Oda ısısında 10 dakika bekletildi</b>		
Folin-ciocalteu ayırıcı (mL)	0,3	0,3

Oda ısısında 30 dakika bekletilen örneklerin, 550 nm' de köre karşı absorbansları okundu. Protein konsantrasyonu standart eğriden değerlendirildi.

### 3.5.2. Histopatolojik İnceleme

Çalışmaya dahil edilen tüm dokulardan elde edilen 5 µ kalınlığındaki parafin kesitler 55°C' deki sıcak su banyosundan lam üzerine alındı. 60°C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısındaki ksilolde 30 dakika bekletildi. %50, %60, %70, %95 derecelik alkol serisinden geçirildi ve akar çeşme suyunda yıkandı. Hematoksilen

solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra tekrar akar çeşme suyunda yıkandı. %0,1 amonyaklı suda 1 saniye bekletildikten sonra tekrar akar çeşme suyunda yıkandı. %96'lık alkolde 1 saniye ve daha sonra eosin solüsyonunda 20 saniye bekletildi. Akar çeşme suyunda yıkandı. %50, %60, %70, %95 derecelik alkol serisinden geçirilen preperatlar kurutuldu. Oda ısısındaki ksilolde 10-20 dakika bekletilerek şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı. Karaciğerde siroz oluşumu İshak Skorlamasına göre yapılmıştır (151).

### **3.5.3. İstatistiksel Analizler**

Çalışmadan elde edilen bulgular istatistiki olarak değerlendirilirken SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 20 programı, Statistica istatistik paket program kullanılmıştır. Tüm parametreler için normallik testi Kolmogorow-Simirnnow testi ile test edilmiştir. Parametrelerin bir kısmı normal dağılım göstermiş diğer bir kısmı ise normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistik metodların (ortalama, standart sapma, minimum-maksimum değerler) yanı sıra normal dağılım gösteren parametrelere One Way Anova testi yapılmış, normal dağılım göstermeyen parametrelere ise Kruskal Wallis testi uygulanmıştır. Farklılık bulunan parametrelere Posthoc testleri uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık  $P < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

## 4. BULGULAR

Bu çalışmaya toplam 64 adet yetişkin, erkek Wistar albino sıçan dahil edildi. Bu çalışmada Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) olmak üzere 6 grup oluşturuldu.

Bu çalışmada karaciğer sirozu üzerine VEGFR-2 inhibitörü; SU 1498' in etkisini araştırmak amacı ile anjiyogenez belirteci olarak VEGFR-2 gen ekspresyonu ve apoptozis yol izi belirteci olarak kaspaz -3, -8 ve -9 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Ayrıca antioksidan kapasitenin araştırılması için GSH ve MDA düzeyleri kolorimetrik yöntemlerle saptandı.

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

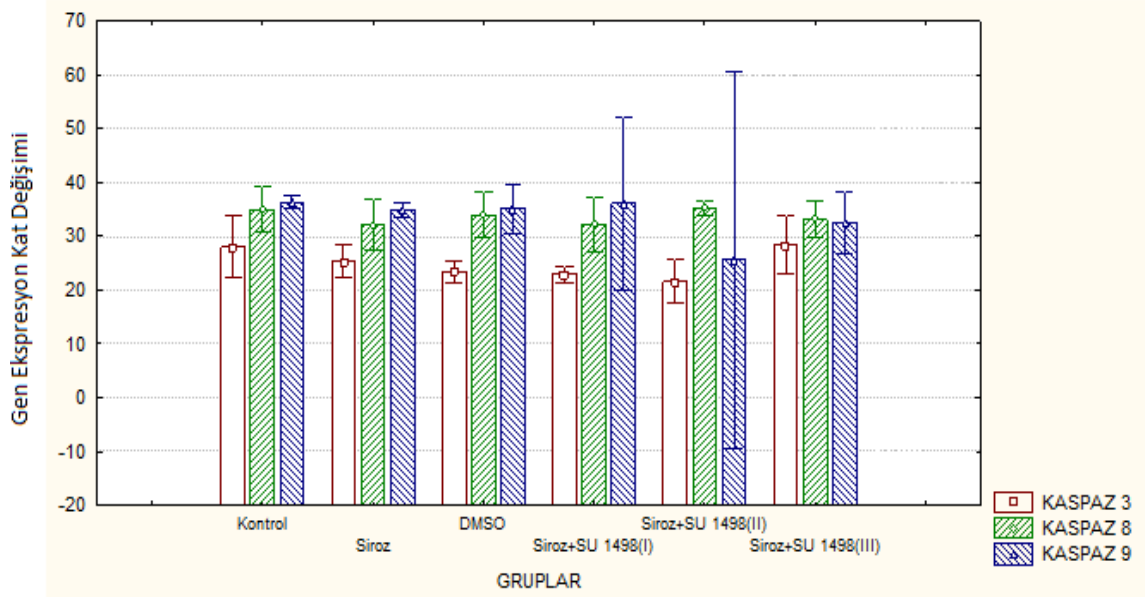
#### 4.1.1. Apoptozis ve Anjiyogenez Belirteçlerine Ait Bulgular

##### 4.1.1.1 Kaspaz -3, -8, -9 Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyon düzeyleri Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

**Çizelge 4.1.** Apoptotik belirteçlerden olan kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.

<b>Grup</b>		<b>Min-max</b>	<b>x±SD</b>
Kontrol	kaspaz-3	22,49-36,51	27,89±5,47
	kaspaz-8	32,95-35,97	34,95±1,73
	kaspaz-9	36,02-36,79	36,27±0,44
Siroz	kaspaz-3	22,23-31,43	25,24±3,70
	kaspaz-8	21,19-37,34	32,04±5,18
	kaspaz-9	33,57-36,40	34,88±1,11
DMSO	kaspaz-3	21,68-27,39	23,34±2,03
	kaspaz-8	28,06-38,87	33,94±4,06
	kaspaz-9	28,45-37,09	35,08±3,72
Siroz+ SU 1498 (I)	kaspaz-3	21,22-23,97	22,91±1,21
	kaspaz-8	27,64-38,01	32,24±4,08
	kaspaz-9	34,76-37,29	36,02±1,78
Siroz+ SU 1498 (II)	kaspaz-3	14,91-26,61	21,61±3,85
	kaspaz-8	33,88-37,01	35,20±1,24
	kaspaz-9	9,73-36,51	25,54±14,03
Siroz+ SU 1498 (III)	kaspaz-3	22,47-36,27	28,34±5,22
	kaspaz-8	29,07-36,21	33,12±2,82
	kaspaz-9	25,41-36,67	32,46±4,67



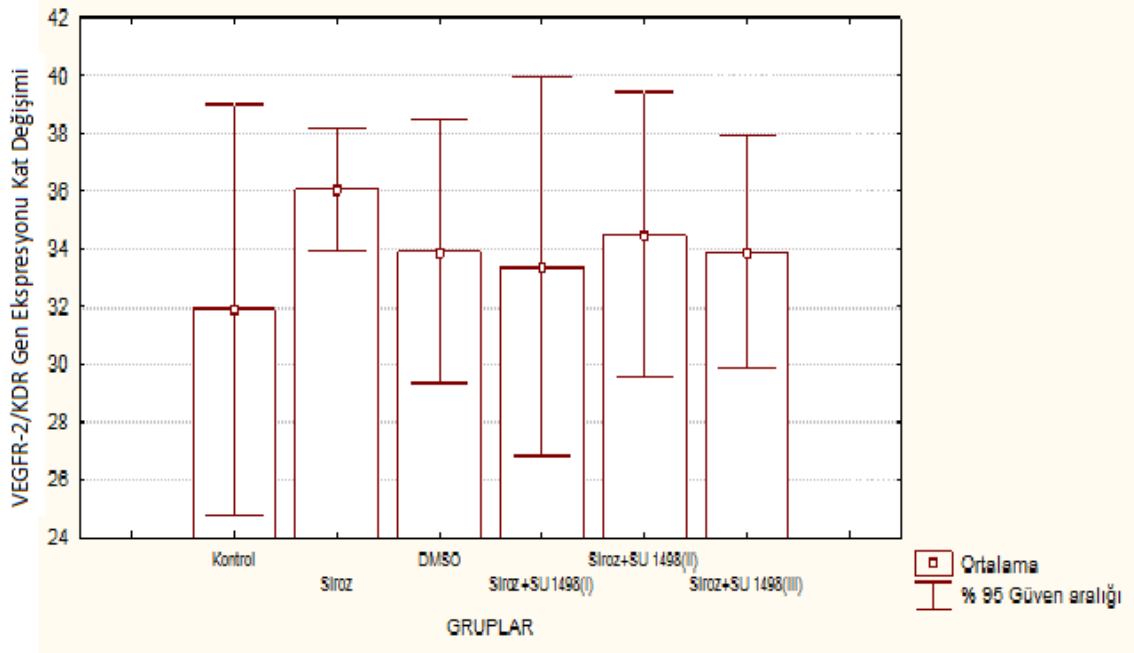
**Şekil 4.1.** Apoptotik belirteçler olan kaspaz-3, -8, -9 gen ekspresyonlarının gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi.

#### 4.1.1.2. VEGFR-2 Gen Ekspresyon Düzeyi

VEGFR-2 gen ekspresyon düzeyleri Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

**Çizelge 4.2.** Anjiyogenez belirteçlerden olan VEGFR-2 gen ekspresyon düzeyinin her bir gruba göre değişimi.

Grup	Min-max	$x\pm SD$
Kontrol	23,06-37,07	31,89±5,72
Siroz	33,31-38,53	36,06±2,03
DMSO	25,91-37,15	33,89±4,35
Siroz+ SU 1498 (I)	25,49-37,55	33,37±5,28
Siroz+ SU 1498 (II)	31,80-37,27	34,49±3,09
Siroz+ SU 1498 (III)	31,57-37,22	33,87±2,51



**Şekil 4.2.** Anjiyogenez belirteci olan VEGFR-2 gen ekspresyonunun gruplar arası karşılaştırmada gösterdiği değişimlerin bar grafik olarak gösterimi.

#### 4.1.2. Antioksidan Kapasite

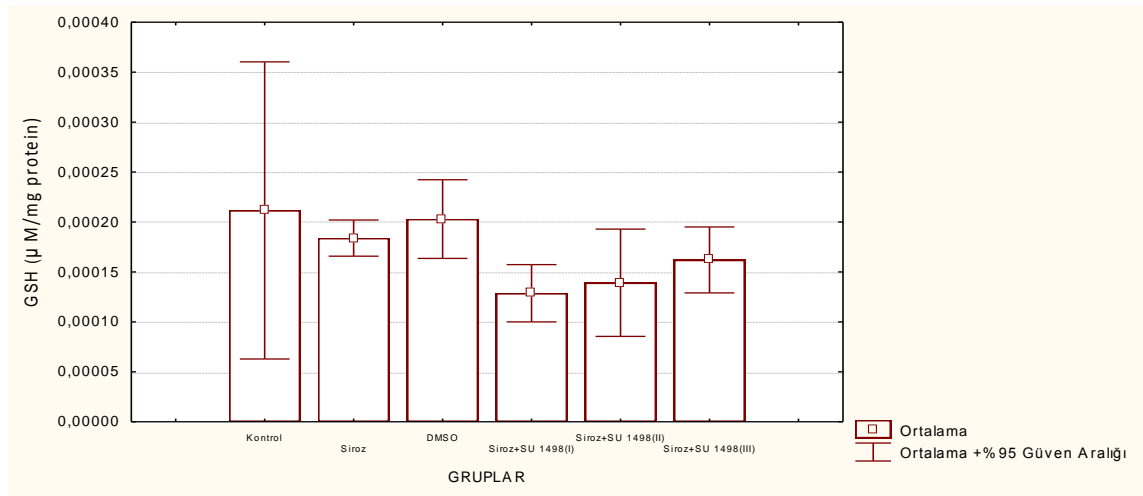
Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacıyla antioksidan sistemde bulunan GSH miktarı ve lipid peroksidasyon göstergesi olarak da MDA düzeyleri belirlenmiştir.

##### 4.1.2.1. Doku GSH Düzeyleri

Bu çalışmada antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için antioksidan sistemde bulunan GSH miktarları incelenmiştir. GSH miktarı düzeyleri Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta), Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

**Çizelge 4.3.** GSH düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi

Grup	Min-max	x±SD
Kontrol (µM/mg protein)	0,00012-0,00042	0,0002±0,00011
Siroz (µM/mg protein)	0,00016-0,00021	0,0001±0,00002
DMSO (µM/mg protein)	0,00017-0,00025	0,0002±0,00003
Siroz+ SU 1498 (I) (µM/mg protein)	0,00010-0,00017	0,0001±0,00002
Siroz+ SU 1498 (II) (µM/mg protein)	0,00008-0,00018	0,0001±0,00004
Siroz+ SU 1498 (III) (µM/mg protein)	0,00014-0,00018	0,0001±0,00002



**Şekil 4.3.** GSH düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi

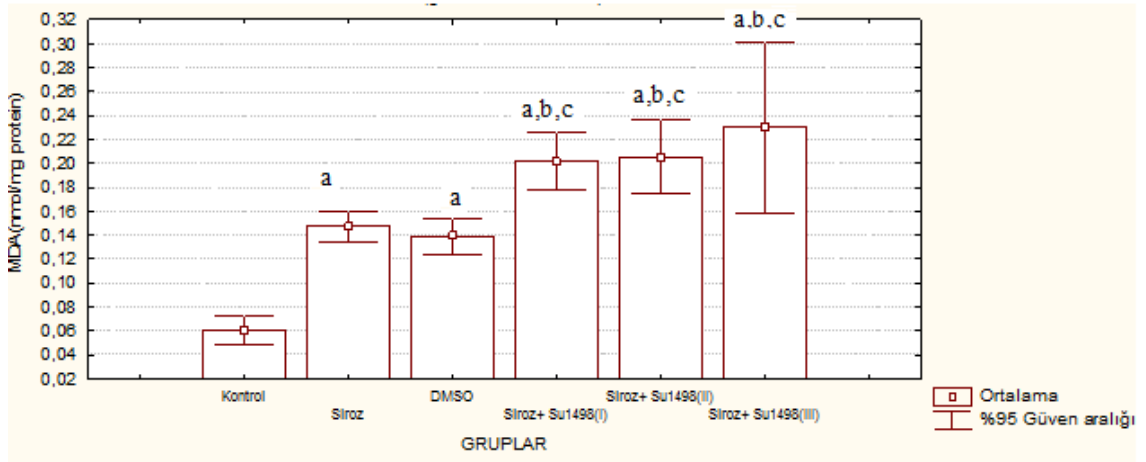
#### 4.1.2.2. Doku MDA Düzeyleri

MDA bakımından gruplar arasında fark bulunmuştur (p:0,0001). MDA bakımından sırasıyla Kontrol ile Siroz (p:0,001), Kontrol ile DMSO (p: 0,001), Kontrol ile Siroz+ SU1498(I) (p:0,001), Kontrol ile Siroz+ SU1498(II) (p:0,001), Kontrol ile Siroz+ SU1498(III) (p:0,001) arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur. Yine MDA bakımından; Siroz ile Siroz+ SU1498(I) (p:0,029), Siroz ile Siroz+ SU1498(II) (p:0,016), Siroz ile Siroz+ SU1498(III) (p:0,001) arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur. Bunlara ek olarak MDA bakımından sırasıyla DMSO ile Siroz+ SU 1498(I) (p:0,013), DMSO ile Siroz+ SU 1498(II) (p:0,007), DMSO ile Siroz+ SU 1498(III) (p:0,0001), arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur.

**Çizelge 4.4.** MDA düzeylerinin gruplar arasındaki değişimi.

GRUPLAR	Min-max	$\bar{x} \pm SD$
Kontrol (nmol/mg protein)	0,052-0,088	0,0605 $\pm$ 0,0124
Siroz (nmol/mg protein)	0,124-0,168	0,1473 $\pm$ 0,0161 <sup>a</sup>
DMSO (nmol/mg protein)	0,118-0,169	0,1391 $\pm$ 0,0159 <sup>a</sup>
Siroz+ SU 1498(I) (nmol/mg protein)	0,160-0,239	0,2016 $\pm$ 0,0264 <sup>a,b,c</sup>
Siroz+ SU 1498(II) (nmol/mg protein)	0,154-0,259	0,2052 $\pm$ 0,0336 <sup>a,b,c</sup>
Siroz+ SU 1498(III) (nmol/mg protein)	0,132-0,330	0,2299 $\pm$ 0,0677 <sup>a,b,c</sup>

a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO grubu ile farklılıkları göstermektedir.  
( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı



**Şekil 4.4.** MDA düzeylerinin gruplar arası değişiminin bar grafik olarak gösterimi. a; Kontrol ile, b; Siroz ile, c; DMSO grubu ile farklılıkları göstermektedir. ( $p < 0,05$ ) istatistiksel olarak anlamlı.

## 4.2. Karaciğer Dokularına Ait Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemeler sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlenmiştir (Şekil 4.5).

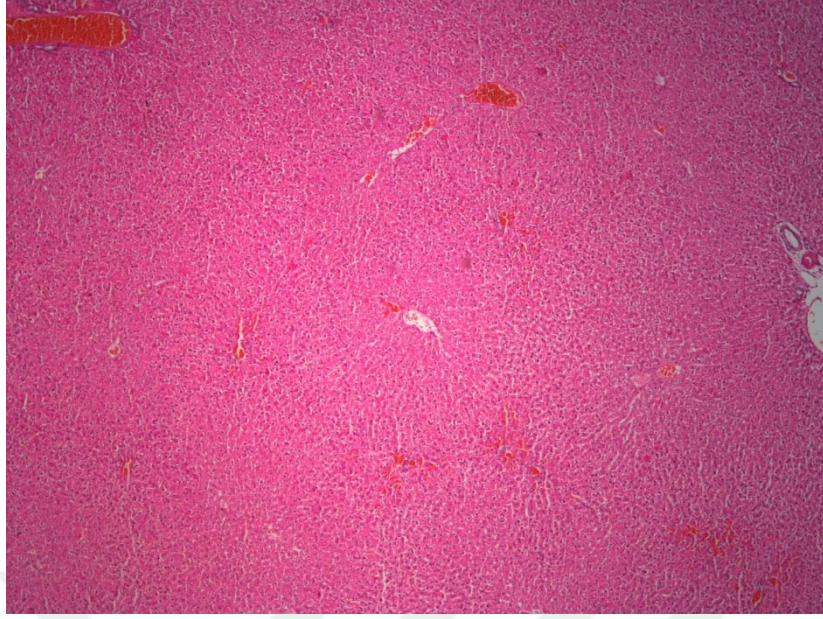
Siroz grubunda sakrifiye edilen sıçanların karaciğer normal yapının bozulduğu; karaciğer dokusunda hepatositlerde büyüme, pleomorfizm, hiperkromazi alanları içeren large cell displazi odağı, zon 3 düzeyinde santral venler, hepatositlerde rejenerasyon bulguları, vasküler disorganizasyon, yer yer displastik değişiklikler, nodül formasyonuna neden olan fibrozis alanları ve siroz gözlenmiştir (Şekil 4.6).

DMSO grubunda; Karaciğer dokusunda portal alanlarda uzun ve ince fibrozis odakları yanı sıra rejenerasyon bulguları ve displastik odaklar ve siroz izlenmektedir (Şekil 4.7).

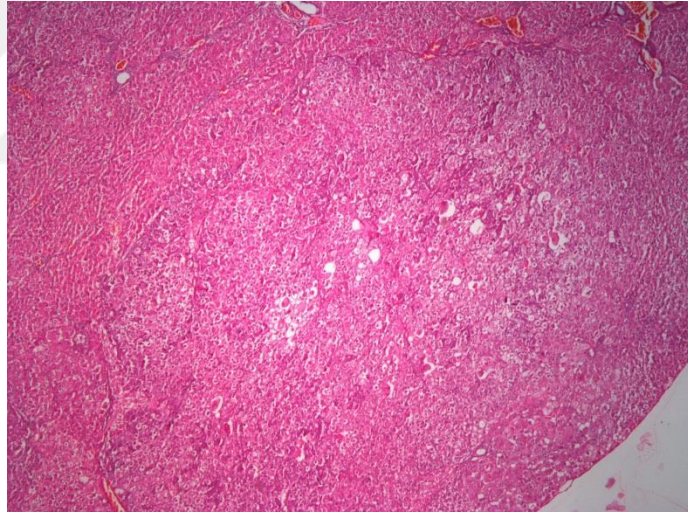
Siroz+SU 1498 (I) grubunda; karaciğer dokusunda tam olarak nodül oluşturmayan fibrozis alanları ve inkomplet siroz gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.8).

Siroz+SU 1498 (II) grubunda; karaciğer dokusunda tam olarak nodül oluşturmayan fibrozis alanları ve inkomplet siroz gelişimi ve siroz gözlenmiştir (Şekil 4.9).

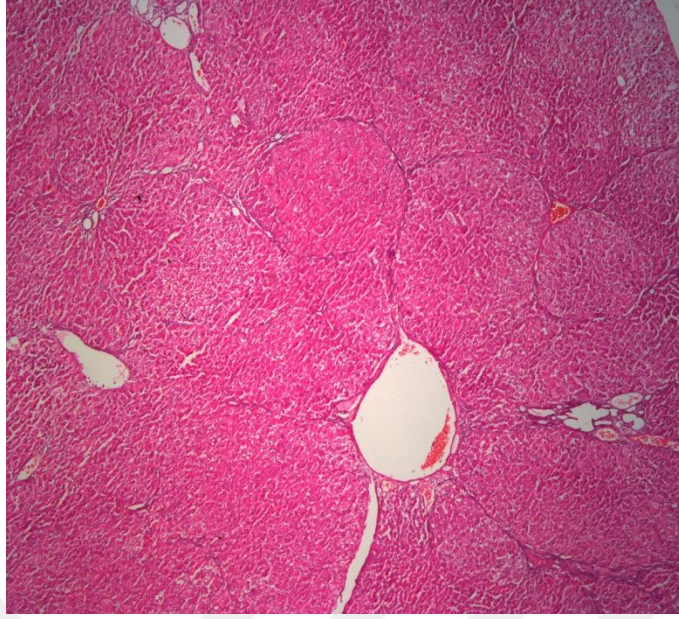
Siroz+SU 1498 (III) grubunda; karaciğer dokusunda oval yuvarlak nükleuslu, belirgin nükleoluslu, yer yer pleomorfizm içeren, eozinofilik sitoplazmalı, belirgin hücre sınırına sahip, en az üç hücre tabakası şeklinde dizilime sahip, mitoz saptanan hepatosellüler karsinom alanları gözlenmiştir (Şekil 4.10).



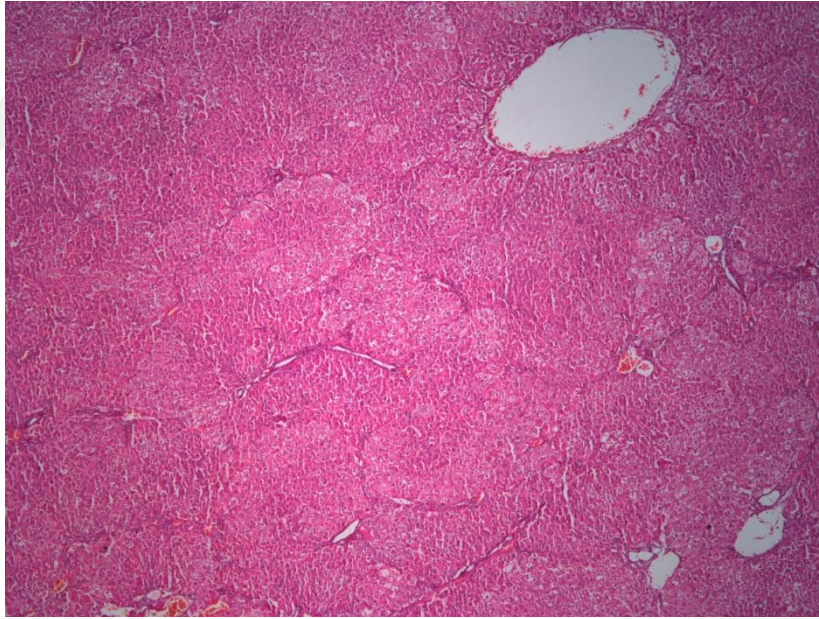
**Şekil 4.5.** Kontrol grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



**Şekil 4.6.** Siroz grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



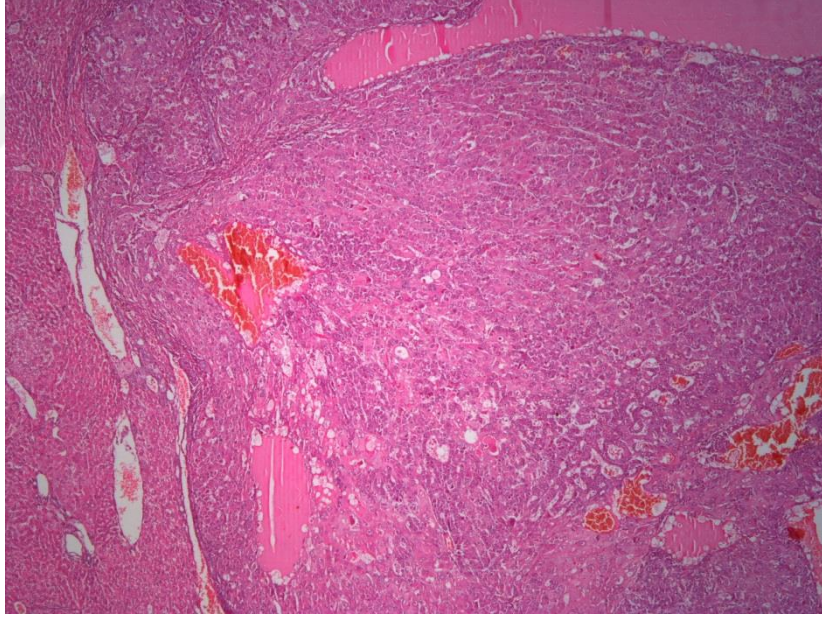
**Şekil 4.7.** DMSO grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



**Şekil 4.8.** Siroz+SU 1498 (I) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*)



**Şekil 4.9.** Siroz+SU 1498 (II) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).



**Şekil 4.10.** Siroz sonrasında+SU 1498 (III) grubundaki sıçanların karaciğer dokularına ait HE boyamalarının fotomikrograf görüntüsü (*HEX100*).

## 5. TARTIŞMA

Karaciğer sirozu, kronik karaciğer hasarının bir sonucudur ve bilinen birçok sebebi bulunmaktadır. Ülkemizde de tüm dünyada olduğu gibi önemli bir sağlık sorunudur ve başlıca nedenleri alkol ve kronikleşen viral hepatitlerdir. Ülkemizde kronik viral hepatitler karaciğer sirozunun nedeni olarak ön plana çıkarken, batı ülkelerinde ise alkol ilk sırayı almaktadır (5, 6).

Bu çalışmada, çevresel bir karsinojen olan ve nitrozaminler arasında önemi bilinen, karaciğer tümörü indükleyicisi DEN, günlük 100 ppm dozda, 13 hafta boyunca içme suyu olarak sıçanlara verildi ve karaciğer sirozu oluşturuldu. Daha önceki yapmış olduğumuz çalışmalarda içme suyuna katılan DEN' in 10-12 hafta boyunca tüketilmesi sonucunda karaciğer sirozu oluşumu ve 18-20 hafta tüketilmesi sonucunda da hepatoselüler karsinom oluşumu gözlemlenmiştir (125, 152, 153). Yapmış olduğumuz çalışmaların sonuçları göz önüne alınarak bu çalışmada da DEN kullanıldı. Çalışmamızda 13. haftada karaciğer sirozu gözlemlendi.

Lee ve arkadaşları, sıçanlara intraperitoneal enjeksiyonlarla 100 mg/kg/hafta DEN uygulayarak sirotik karaciğer oluşumunu bildirmişlerdir (154). Finnberg ve arkadaşları, sıçanlara DEN uygulayarak akut karaciğer hasarı oluşturduklarını bildirmişlerdir (155). Bona ve arkadaşları da 7 hafta boyunca, 50 mg/kg ve haftada iki kere olacak şekilde DEN uygulamasıyla karaciğer yapısının değiştiğini ve hepatik siroz oluştuğunu bildirmişlerdir (156).

Anjiyogenez, var olan kan damarlarından yeni damar oluşumunun gözlemlendiği fizyolojik bir süreçtir (157). Patolojik durumlarda da görülebilen anjiyogenez, proanjiyogenik ve antianjiyogenik faktörler tarafından kontrol edilmektedir (36). VEGF fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde önemli bir role sahip olan trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin bir üyesidir (10, 12). VEGFR-2 (flk/KDR) ise VEGF' in yüksek afiniteli tirozin kinaz reseptörüdür ve özellikle kanserde oluşan anjiyogenezde önemi bilinmektedir (70).

Bu çalışmada, VEGFR-2 inhibitörü, SU 1498' in (19) karaciğer sirozu üzerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, karaciğer sirozu oluşturulmuş sıçanlarda anjiyogenez belirteci olarak VEGFR-2 gen ekspresyonu ve apoptozis yol izi belirteci olarak kaspaz -

3, -8 ve -9 gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Antioksidan kapasitenin araştırılması için ise GSH ve MDA düzeyleri kolorimetrik yöntemlerle belirlendi.

Çalışmamızda; VEGFR-2 gen ekspresyonunda Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) ve Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Jin ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, SU 1498' in VEGFR-2 inhibitörü olduğunu ortaya koymuşlardır (158). Koyanagi ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada tümör hücrelerinde VEGF' in 24 saatlik ekspresyonunun regülasyon mekanizmasını değerlendirmiş ve VEGFR-2 inhibitörü olarak SU 1498' i göstermişlerdir (55).

Hao, yapmış olduğu çalışmada, VEGF' in önemli bir anjiyogenik faktör olduğunu ve SU 1498' in de VEGFR-2 inhibitörü olduğunu belirtmiştir (159).

Cebulla ve arkadaşları ise çalışmalarında transgenik sıçan retinoplastomunda VEGFR-2 inhibitörü, SU 1498' in değerlendirmişlerdir. SU 1498 ve DMSO kontrol grubu olmak üzere iki grup ile çalışılmıştır. SU 1498' in dozu dikkatli bir şekilde seçilmiş ve hem göz çevresinden enjeksiyonla hem de burundan sondayla verilmiştir. Ancak, SU 1498 tedavisinden sonra, tedavi edilen gözlerde tümör yükü çok düşük olmasına rağmen, DMSO kontrol grubuyla arasında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken; VEGFR-2' de ise artış bulunmuştur. VEGFR-2 inhibitörü, SU 1498 tedavide yetersiz kalmıştır (70).

Hipoksiyle İndüklenen Mitojenik Faktörünün (HIMF) anjiyogenik etkisi olduğu ve VEGF düzeyini arttırdığı bilinmektedir. Tong ve arkadaşları daha önceki yaptıkları çalışmada HIMF' in fare akciğerlerinde VEGF üretimini önemli şekilde arttırdığını saptamışlardır. Bir sonraki çalışmalarında ise HIMF' in, PI-3K/Akt yolağını aktive ederek endotelial hücrelerde proliferasyonu ve migrasyonunu uyararak anjiyogenezi arttırdığını saptamışlardır. Bu çalışmalarında SU 1498 ile yapılan tedavide, HIMF indüklü endotelial hücrelerde VEGFR-2 inhibe edilmediğini ve endotelial hücrelerin proliferasyonunun, migrasyonunun ve tüp oluşumunun ortadan kaldırılamadığını saptamışlardır (160).

Apoptozis, multiselüler organizmalarda dokunun homeostazisi ve gelişimi açısından önemli rol oynayan, tipik morfolojik özellikler gösteren kontrollü hücre

ölümüdür. Apoptozis regülasyonunda meydana gelen bozukluklar çeşitli hastalıkların gelişimini de beraberinde getirir (16, 102). İnsan organizmasında apoptozis birçok fizyolojik ve patolojik durumda gözlemlenebilir (14). Apoptozisin gerçekleşmesinde, hücre içi proteazlar olan kaspazların aktivasyonu gereklidir (100). Günümüzde kaspaz kaskadını başlatarak apoptozisi sağlayan birçok mekanizma bulunmakta ve araştırılmaktadır. En önemli iki temel mekanizma olarak da ölüm reseptörleri aracılı ekstrinsek yolak ve mitokondri aracılı intrinsek yolak gösterilmektedir (97).

Kaspaz-3 apoptoziste rol oynayan ve her iki yolakta da ortak olan efektör bir kaspazdır. Bu çalışmada kaspaz-3 gen ekspresyonu açısından, Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) ve Siroz Sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Sun ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, karaciğer kanserinde kaspaz-3 gen ekspresyonunun apoptozis indeksi ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Buna rağmen, kaspaz-3 gen ekspresyonundaki azalmanın apoptozis mekanizmasını negatif yönde etkilediği belirtilmiştir. Bu çalışmada XIAP' in kaspaz-3' ü inhibe ettiği düşünülmüştür (161).

Bantel ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada kaspaz-3' ün, karaciğer hasarının tanımlanması açısından önemli bir belirteç olduğunu bildirmişlerdir (162).

Apoptozis mekanizmasında ekstrinsek yol izi, transmembran reseptör aracılı apoptozisi başlatan yolaktır (101). Bu yol izinde ölüm reseptörleri, ligandları ile birleşerek bir kompleks oluştururlar. Daha sonra oluşan bu komplekse bir adaptör bağlanır ve DISC oluşur. DISC, başlatıcı kaspaz olan kaspaz-8' in aktivasyonunu sağlar ve böylece apoptozis fazı başlar (117, 132).

Bu çalışmada kaspaz-8 gen ekspresyonu açısından, Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) ve Siroz sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Li ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, sıçanlarda nonalkolik yağlanmış karaciğer hastalıkları patogenezinde kaspaz-8' in rolünü araştırmışlardır. Bu çalışmada, artan yağlanmış karaciğer hasarıyla kaspaz-8' in de anlamlı derecede arttığı belirtilmiştir (163).

İntrensek yolak, çeşitli sinyaller aracılığı ile mitokondride açılan porlardan başta sitokrom-c olmak üzere proapoptotik proteinlerin salınması ile başlayan bir olaydır. Sitokrom-c sitozole salındıktan sonra Apaf-1 ile bağlanır ve daha sonra yapıya kaspaz-9 katılır. Oluşan bu moleküle apoptozom adı verilir. Bu olay kaspaz-9' da konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve kaspaz-9 aktif hale geçer (117, 134).

Bu çalışmada kaspaz-9 gen ekspresyonu açısından, Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) Ve Siroz Sonrasında+SU 1498 (III) (300µg/kg/hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Gong ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, oksidatif stres, Fas aracılı ölüm yolağı ile ilişkilendirilmiştir. Alkolik karaciğer hasarlı hastalarda, hepatositlerde yüksek seviyede FasL mRNA ekspresyonu gözlemlenmiştir. FasL ekspresyonunun reaktif oksijen tarafından indüklendiği düşünülmektedir. Hepatositlerin de Fas reseptörü eksprese etmesi, hepatositlerin parakrin ya da otokrin mekanizması ile kendi ölümlerini sağladıkları ihtimalini ortaya çıkarmaktadır. Diğer taraftan Gong ve arkadaşları bu çalışmada, hasarlı karaciğerde, RNA tarafından kodlanan bir proteinin oksidatif stres yoluyla NF-κB' ü indüklediğini bildirmişlerdir. Bu durum, NF-κB' nin, kronik karaciğer hastalıklarında antiapoptotik etki sağlayarak, hepatositleri apoptozisten koruduğunu göstermektedir (164).

Birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan serbest oksijen radikalleri lipit peroksidanları, protein denatürasyonu ve nükleik asit hasarlanması gibi etkilerle hücrel işlev bozukluklarına sebep olmaktadır (143). Hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve süperoksit anyonu gibi ROT' ların artmasıyla oksidatif stres meydana gelir (165). DEN gibi nitrozaminler, reaktif oksijen türleri sayesinde oksidatif stresi indüklemektedir ve bu durum peroksidatif hücre hasarını başlatmaktadır (166).

DEN ile karaciğer sirozu oluşturulmuş çalışmamızda, önemli bir antioksidan olan GSH düzeyi incelenmiştir. Kontrol, Siroz, DMSO, Siroz+SU 1498 (I) (250µg/kg/hafta), Siroz+SU 1498 (II) (500µg/kg/hafta) ve Siroz sonrasında+SU 1498 (I) (300µg/kg/hafta) grupları arasında GSH düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Karahan ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, hücre bütünlüğünün korunmasında önemli etkileri olan ve serbest radikalleri temizleyen GSH düzeyinin

DEN uygulanan grupta kontrol grubuna göre azalmanın olduğunu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (167). Günümüzde bazı araştırmalar oksidatif strese bağlı olarak GSH düzeyinde anlamlı şekilde azalma gösterirken, bazı araştırmalar, GSH düzeylerinde bir değişiklik göstermemektedir (167). Bansal ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, eritrositlerde total GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir (166).

Vücutta GSH içeriğinin en önemli kaynağı karaciğer olarak belirlenmiştir (167). GSH'ın, ROT'ün hücrelerden uzaklaştırılması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu gibi önemli fonksiyonlara sahip olduğu belirlenmiştir (168). Karaciğerin kompleks mekanizması ve diğer organlara göre GSH içeriğinin çok daha fazla olması çalışmamızda kullandığımız SU 1498' in bir ksenobiyotik olarak detoksifiye edilmiş olması ihtimalini düşündürmektedir. Bu ihtimal gruplar arasında herhangi bir değişiklik olmamasına açıklık getirebilir.

Yaptığımız çalışmada MDA lipit peroksidasyonu göstergesi olarak incelenmiş ve gruplar arasında fark bulunmuştur (p:0,0001). MDA bakımından sırasıyla Kontrol ile Siroz (p:0,001), Kontrol ile DMSO (p: 0,001), Kontrol ile Siroz+ SU 1498(I) (p:0,001), Kontrol ile Siroz+ SU 1498(II) (p:0,001), Kontrol ile Siroz+ SU 1498(III) (p:0,001) arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur. Yine MDA bakımından; Siroz ile Siroz+ SU 1498(I) (p:0,029), Siroz ile Siroz+ SU 1498(II) (p:0,016), Siroz ile Siroz+ SU 1498(III) (p:0,001) arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur. Bunlara ek olarak MDA bakımından sırasıyla DMSO ile Siroz+ SU 1498(I) (p:0,013), DMSO ile Siroz+ SU 1498(II) (p:0,007), DMSO ile Siroz+ SU 1498(III) (p:0,0001), arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur.

Özellikle karaciğer olmak üzere, birçok deneysel çalışmada nitrozamin türlerinin uygulanmasının lipit peroksidasyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir. Çalışmalarda lipit peroksidasyon artışının MDA düzeyleri ile karakterize olduğu düşünülmektedir (167).

Karahan ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, karaciğerde tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir (167).

Dede ve arkadaşları, karaciğer sirozlu hastalarda oksidatif stres belirteçleri üzerine yapmış oldukları çalışmada, sirozun evreleri arasında yapılan karşılaştırmada,

hastalığın artmasıyla MDA düzeylerinde de anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir (143).

Histopatolojik incelemeler sonucunda kontrol gruplarındaki sıçanlarda normal karaciğer dokusu gözlenmiştir. Siroz grubunda sakrifiye edilen sıçanların karaciğer normal yapının bozulduğu; karaciğer dokusunda hepatositlerde büyüme, pleomorfizm, hiperkromazi alanları içeren large cell displazi odağı, zon 3 düzeyinde santral venler, hepatositlerde rejenerasyon bulguları, vasküler disorganizasyon, yer yer displastik değişiklikler, nodül formasyonuna neden olan fibrozis alanları ve siroz gözlenmiştir. DMSO grubunda; karaciğer dokusunda portal alanlarda uzun ve ince fibrozis odakları yanı sıra rejenerasyon bulguları ve displastik odaklar ve siroz izlenmektedir. Siroz+SU 1498 (I) grubunda; karaciğer dokusunda tam olarak nodül oluşturmayan fibrozis alanları ve inkomplet siroz gelişimi gözlenmiştir. Siroz+SU 1498 (II) de ise inkomplet siroz ve siroz olduğu gözlenmiştir. Siroz süresince verilen SU 1498' in 250µg/kg/hafta dozu profilaktik açıdan bir tedavi seçeneği olurken; siroz sonrasında verilen 300µg/kg/hafta dozunun bir tedavi seçeneği olmadığı saptanmıştır.

VEGF'in endotel hücre yüzeyindeki reseptörlerine bağlanması fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K/Akt) ve endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) sinyalleri gibi anjiyogenezi destekleyen multi sinyal kaskadlarının başlamasına neden olmaktadır. PI3K ailesi hücre proliferasyonu, differansasyonu ve migrasyonunu regüle eden birçok sinyal yolağı ile ilişkilendirilir. Bu da meydana gelen anjiyogenezi destekler. Akt eNOS downstream kaskadını aktive eder; NO ve eNOS fosforilasyonunu destekler, endotel hücre bölünmesini başlatır, proliferasyon ve migrasyonu sağlar ve anjiyogenezin meydana gelmesini destekler. Kang ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada, protokateşik asitin anjiyogenezi ve PI3K-Akt-eNOS-VEGF sinyal yolağını nasıl indüklediği araştırılmıştır. Güncel çalışmalar, protokateşik asitin anjiyogenezi desteklediğini, PI3K-Akt-eNOS-VEGF sinyal yolağını aktif hale getirdiğini ve VEGF' in ekstraselüler seviyesini arttırdığını göstermektedir. Yapılan bu çalışmada, protokateşik asitin anjiyogenezi VEGF ile indüklediği, eNOS ekspresyonunu ve NO üretimini arttırdığı görülmüştür. VEGFR-2 inhibitörü SU 1498' in protokateşik asit indüklü tüp oluşumunu önemli derecede düşürdüğü bildirilmiştir (157).

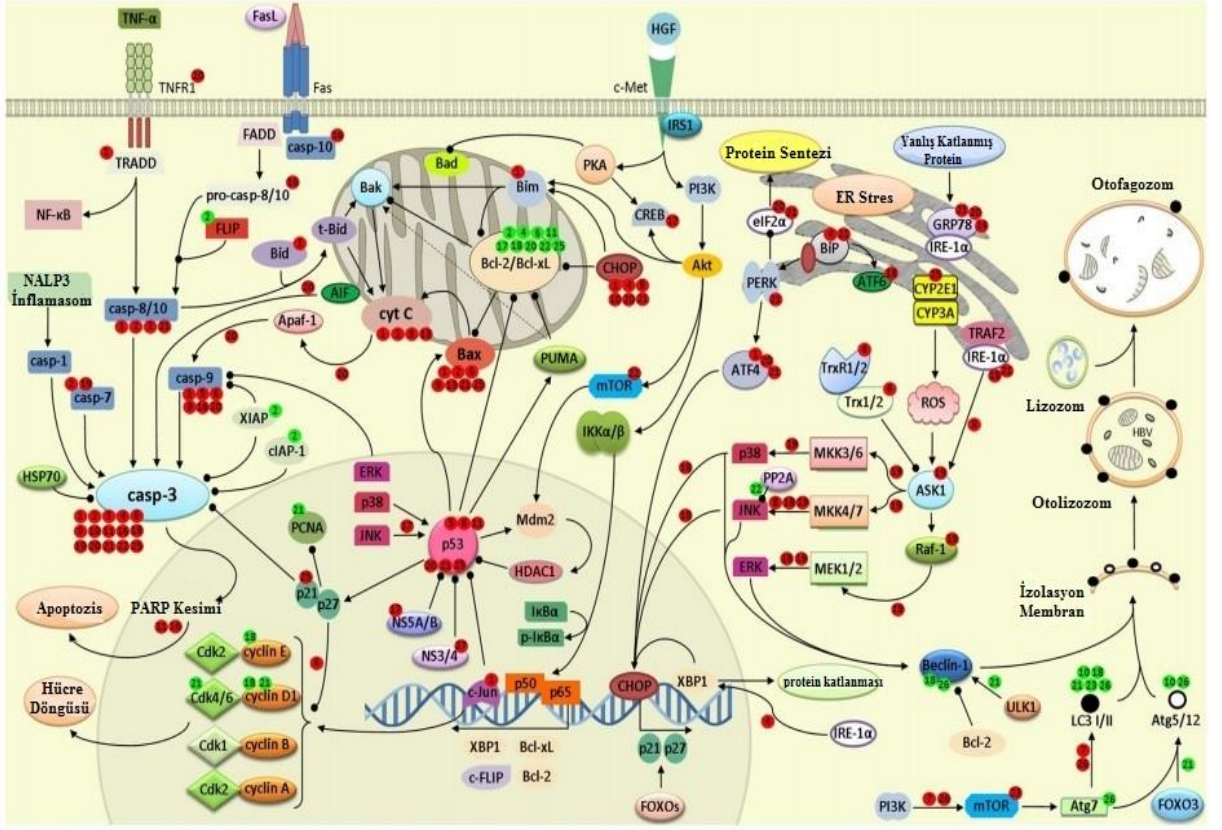
Kang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, kullandıkları ilacın (Cornin), serebral endotel hücrelerde PI3K/Akt sinyal yolağını aktive ettiğini, eNOS sentezini

indüklediğini ve VEGF' in ekstraselüler seviyesini arttırdığını belirtmişlerdir. Endotelial hücre yüzeylerinde VEGF' in reseptörlerine bağlanmasıyla, intraselüler tirozin kinazların aktive olduğu, PI3K/Akt ve eNOS sinyallerini de içeren çoklu downstream sinyallerinin anjiyogenezi indüklediği gösterilmiştir (169).

VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerini bloklayarak angienez oluşumunu önlemek pek çok çalışmanın amacını olmuştur. Casanovas ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada antiVEGF kullanılan spontan tümör oluşmuş deneysel farelerde, uzun süreli ilaç kullanım sonucu tümör hücrelerinin farklı anjiyogenik faktörler kullanarak anjiyogenezi sürdürdüğü belirtilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, VEGFR-2' nin anjiyogenik şalter için elzem olduğu, tümör anjiyogenezi sırasında arttığı gözlemlenmiştir. İnhibitör ile VEGFR-2 bloke edilmiştir. Ancak ilk 10 günde etkin olan inhibitör; inhibitörün 4 hafta kadar uzun süreli kullanımında ise inhibitöre karşı bir penotipik direnç oluştuğu; VEGF bağımsız ve hipoksi ilişkili bir yolak ile tümör angienez oluşumunun tekrar aktive olduğu ve tümör hücrelerinin yeniden büyümesine ve vaskülarize olmasına olanak sağladığı gözlenmiştir. Bu alternatif yolda proangiogenik faktörler olarak FGF ailesinin üyelerinin olduğu gözlenmiştir. Casanovas ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma ile VEGFR-2' nin hızlı ve farklı bir mekanizmaya sahip olduğunu göstermektedir (56).

Karaciğerde hepatositler ve stellat hücreler, birçok koruyucu mekanizma içermektedir. Stellat hücreler sitotoksik sitokinler, safra asitleri ve reaktif oksijenler gibi mekanizmalara cevap olarak proliferasyona uğramaktadır. Akut ve kronik karaciğer hasarı siroza neden olan tamir mekanizmasını indükleyebilir. Bu olay stellat hücrelerin merkezi rol oynadığı bir süreçtir. Stellat hücrelerde hedef gen olarak bulunan NF- $\kappa$ B, stellat hücreleri hücre ölümüne karşı korur. Karaciğer sirozunda ve karaciğer sirozu tedavisinde stellat hücreler merkezi hücrelerdir (170).

Yukarıda da belirttiğimiz şekilde son yıllarda yapılan çalışmaların birçoğunda VEGF reseptörünün ve SU 1498' in PI3K-Akt-eNOS-VEGF sinyal yolağını kullandığı görülmüştür (56, 157, 169). VEGF etki mekanizması açısından birçok organda farklı yollar kullanılmaktadır. Karaciğer pek çok yolağın olduğu karmaşık bir mekanizmaya sahiptir (Şekil 5.1.). Ayrıca karaciğerin diğer organlara göre daha hızlı mekanizmalara sahip olduğu bilinmektedir (171).



Şekil 5.1. Hasarlı karaciğer dokusunun antiapoptotik mekanizması (171).

Sonuç olarak; bu çalışmamızda, karaciğerde VEGFR-2 inhibitörü SU 1498; apoptotik belirteçlerden kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9, anjiyogenik belirteçlerden VEGFR-2 ve antioksidan kapasite üzerine bir etki göstermezken ilginç bir şekilde sirozu önlemiştir. SU 1498 farklı bir yolak ile bu etkiyi göstermiş olabilir. Karaciğer hızlı bir dinamiğe sahip organ olduğundan SU 1498' in bu belirteçler üzerine etkilerini araştırmak için daha spesifik çalışmalar stellat hücrelerinde sürdürülebilir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda deneysel karaciğer sirozu oluşturuldu ve bir VEGFR-2 inhibitörü olan SU 1498' in anjiyogenez ve apoptozis üzerine etkisi araştırıldı. VEGFR-2 inhibitörü, SU 1498' in 250µg/kg/hafta ve 500µg/kg/hafta dozları karaciğer sirozu oluşum süresince, 300µg/kg/hafta dozu ise karaciğer sirozu oluştuktan sonra uygulandı.

Sonuç olarak; bu çalışmamızda, karaciğerde VEGFR-2 inhibitörü SU 1498; apoptotik belirteçlerden kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9, anjiyogenik belirteçlerden VEGFR-2 ve antioksidan kapasite üzerine bir etki göstermezken ilginç bir şekilde histopatolojik incelemeler sonucunda SU 1498 (I)' in 250µg/kg/hafta grubunda sirozu önlediği gözlenmiştir.

Karaciğer hızlı bir dinamiğe sahip organlardan birisidir. Pek çok metabolik yolak karaciğerde gerçekleşmektedir ve bu yollar birbiri ile sürekli iletişim halindedir. SU 1498 farklı bir yolak ile siroz oluşumunu engellemiş olabilir.

Bu çalışma total karaciğer dokularında gerçekleştirilmiştir. SU 1498' in bu apoptotik ve anjiyogenik belirteçler üzerine etkilerini araştırmak için stellat hücreleri gibi daha spesifik hücrelerde bu çalışmalar sürdürülebilir. Ayrıca; bazı çalışmalarda anjiyogenez oluşum süresinde zamanla SU 1498' e bir direnç olduğu ve angiogenezin başka yollardan gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu nedenle; SU 1498 ile farklı zaman, doz aralıklarında ve yollarda yeni çalışmalar yapılabilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Karagöz İ, Haktanır A.** Kronik karaciğer hastalıkları. TAD, **2004**; 2 (2): 33-40.
2. **Brancatelli G, Federle MP, Ambrosini R, Lagalla R, Carriero A, Midiri M, Vilgrain V.** **Cirrhosis: CT and MR imaging evaluation.** Eur J Radiol. **2007**;61(1):57-69.
3. **Rockey DC, Friedman SL.** Hepatic fibrosis and cirrhosis. Section I: Pathophysiology of the liver. **2006**; 87-109.
4. **Kumar M, Sarin SK.** Is cirrhosis of the liver reversible. Indian J Pediatr. **2007**; 74(4):393-9.
5. **Ökten A.** Türkiye’de Kronik Hepatit, Siroz ve Hepatosellüler Karsinoma Etiyolojisi. *Gastroenteroloji*. **2001**; 23:34-35.
6. **Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet JM.** Focus on hepatocellular carcinoma. Cancer Cell. **2004**; 5(3):215-9.
7. **Paternostro C, David E, Novo E, Parola M.** Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. World J Gastroenterol. **2010**;16(3):281-8.
8. **Olgar Ş, Yetgin S.** *Anjiogenezis Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. **2003**; 46: 139-147.
9. **Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV.** Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. Blood **2000**; 95: 2304-2311.
10. **Demirci U.** Karaciğer hastalıklarında vasküler endotelial büyüme faktör (vascular endothelial growth factor, VEGF) düzeyleri. Uzmanlık tezi, T.C sağlık bakanlığı haseki eğitim ve araştırma hastanesi 3. İç hastalıkları kliniği, İstanbul **2006**.
11. **Mangi MH, Newland AC.** Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. Br Haematol **2000**; 111: 43-51.
12. **Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, Kurozumi M, Manabe T, Wada H, Tanaka F.** Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. Br J Cancer. **2004**; 91(3):498-503.
13. **Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY, Hebbel RP.** VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. Exp Cell Res. **1999**;247(2):495-504
14. **Öztürk F.** *Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 9(2) 143-148 **2002**.
15. **Koçtürk S.** Kanserli Hücre Davranışının Moleküler Temelleri Apoptoz Üzerine Etki Eden Faktörler. Erişim: <http://www.mikrobik.net/page.php?id=771>. Erişim tarihi: **2009-11-06**.
16. **Gordeeva AV, Labas YA, Zvyagilskaya RA.** Apoptosis in unicellular organisms: mechanisms and evolution. Biochemistry (Mosc). **2004**; 69(10):1055-66.
17. **Kiliçarslan A, Kahraman A, Akkiz H, Yildiz Menziletoğlu S, Fingas CD, Gerken G, Canbay A.** Apoptosis in selected liver diseases. Turk J Gastroenterol. **2009**; 20(3):171-9.
18. **Robbins SL CR.** Robbins and Cotran pathologic basis of disease, 7 th edn. Philadelphia: Elsevier Saunders; **2005**.

19. **Cebulla CM, Jockovich ME, Boutrid H, Piña Y, Ruggeri M, Jiao S, Bhattacharya SK, Feuer WJ, Murray TG,** Lack of Effect of SU1498, an Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2, in a Transgenic Murine Model of Retinoblastoma. *Open Ophthalmol J.* **2008;** 2: 62–67.
20. **Strawn LM, McMahan G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawver LK.** Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res.* **1996;** 56(15):3540-5.
21. **Özdemir S.** Karaciğer sirozunun kliniği. *Sempozyum Dizisi.* **2002;** 28: 93-96.
22. **Sonsuz A.** Karaciğer Sirozunun Etyolojisi ve Patogenezi. *Sempozyum Dizisi.* **2002;** 28: 87-91.
23. **P. P. Anthony, K. G. Ishak, N. C. Nayak, H. E. Poulsen, P. J. Scheuer, and L. H. Sobin** The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull World Health Organ.* **1977;** 55(4): 521–540.
24. **Dülger CD, Esen R, Tuncer İ, Türkdöğän K.** *Dekompanse Karaciğer Sirozlu Hastalarda Hepatosellüler Kanser (HSK) Açısından Tanısal Değerler. Van Tıp Dergisi:* 13 (4): 113-117, **2006.**
25. **Yazıcı O, Bahar K.** Hepatosellüler Karsinomda Yeni Tanı ve Tedavi Yöntemleri. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi,* **2008;** 47-52.
26. **Abdel Aziz MT, El-Miligy D, Amin MA, El Ansari A, Ahmed HH, Marzouk S, Sabry D.** Molecular evaluation of apoptotic versus antiapoptotic angiogenic markers in hepatocellular carcinoma. *Clin Biochem.* **2008;**41(12):1008-14.
27. **Sonsuz A.** Karaciğer Sirozunda Hasta Takibi ve Klinik Sorunlar. *Sempozyum Dizisi.* **2007;** 58: 99-112.
28. **Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L.** Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* **1979;** 76: 710-719.
29. **Seyer JM, Huherson ET, Kang AH.** Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* **1977;** 59: 241-248.
30. **Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG.** Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis.* **2001;** 21(3):351-72.
31. **Geerts A.** *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. Semin Liver Dis.* **2001;** 21(3):311-35.
32. **Friedman SL, Bansal MB.** Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy. *Hepatology.* **2006;** 43(2 Suppl 1):S82-8.
33. **Mormone E, George J, Nieto N.** Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact.* **2011;** 193(3):225-31.
34. **Torres M, Poynard T.** Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Ann Hepatol.* **2003;** 2(1):5-11.
35. **Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S.** Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* **2002;** 7:d793-807.

36. **Carmeliet P, Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. **2000**; 407(6801):249-57.
37. **Karamysheva AF.** Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. **2008**; 73(7):751-62.
38. **Iruela ML.** The Cell Biology of Angiogenesis. *Arispe*. **2005**; 1-30.
39. **Sato Y.** Molecular diagnosis of tumor angiogenesis and anti-angiogenic cancer therapy. *International Journal of Clinical Oncology*. **2003**; 8(4):200-206.
40. **Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM.** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. **1998**; 91(10):3527-61.
41. **Tortora G, Melisi D, Ciardiello F.** *Angiogenesis: a target for cancer therapy*. *Curr Pharm Des*. **2004**; 10(1):11-26.
42. **Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ.** Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg*. **2007**; 392(3):371-9.
43. **Aydın R.** *Tümör Anjiyogenezi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Öğrenci Dergisi* **2008**; 1: 1.
44. **Özuysal S.** *Tümöral Anjiyogenezis. Türk Patoloji Dergisi*, **2001**; 17 (3-4):90-93.
45. **Goossell DS.** The Molecular Perspective: VEGF and Angiogenesis. *Stem Cells*, **2003**; 21: 118-119.
46. **Kerbel RS.** Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. **2000**; 21(3):505-15.
47. **Zetter BR.** Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med*. **1998**; 49: 407-24.
48. **Friesel RE, Maciag T.** Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J*. **1995**; 9(10):919-25.
49. **Kanazawa H.** VEGF, angiopoietin-1 and -2 in bronchial asthma: new molecular targets in airway angiogenesis and microvascular remodeling. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. **2007**; 1(1):1-8.
50. **Kaseb AO, Hanbali A, Cotant M, Hassan MM, Wollner I, Philip PA.** Vascular endothelial growth factor in the management of hepatocellular carcinoma: a review of literature. *Cancer*. **2009**; 115(21):4895-906.
51. **Ferrara N.** Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*. **1999**; 56(3):794-814.
52. **Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. **1989**; 246(4935):1306-9.
53. **Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G.** Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. **1996**; 93(8):1493-5.
54. **Dachs GU, Tozer GM.** Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*. **2000**; 36(13 Spec No):1649-60.

55. **Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, Aramaki H, Ohdo S, Soeda S, Shimeno H.** A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Res.* **2003**; 63(21):7277-83.
56. **Casanovas O, Hicklin D J, Bergers G, Hanahan D.** Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell.* **2005**; (4):299-309.
57. **Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* **2003**; 9(6):669-76.
58. **Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N.** Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* **1992**; 267(36):26031-7.
59. **Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW.** The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* **1991**; 5(12):1806-14.
60. **Zachary I, Glick G.** Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res.* **2001**; 49(3):568-81.
61. **Rosmorduc O, Wendum D, Corpechot C, Galy B, Sebbagh N, Raleigh J, Housset C, Poupon R.** Hepatocellular hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in experimental biliary cirrhosis. *Am J Pathol.* **1999**;155(4):1065-73.
62. **Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* **2000**; 407(6801):242-8.
63. **Nalbandian A<sup>1</sup>, Dettin L, Dym M, Ravindranath N.** Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod.* **2003**; 69(3):985-94.
64. **Lamszus K, Ulbricht U, Matschke J, Brockmann MA, Fillbrandt R, Westphal M.** Levels of soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. *Clin Cancer Res.* **2003**; 9(4):1399-405.
65. **Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushima H, Sato M.** Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene.* **1990**; 5(4):519-24.
66. **Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB.** Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* **1991**; 6(9):1677-83.
67. **Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC.** Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* **1995**; 376(6535):62-6.
68. **Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM.** Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94: 5141-5146.
69. **Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ.** Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.* **1994**; 68(1):84-92.
70. **Cebulla CM, Jockovich ME, Boutrid H, Piña Y, Ruggeri M, Jiao S, Bhattacharya SK, Feuer WJ, Murray TG.** Lack of Effect of SU1498, an Inhibitor of Vascular Endothelial

Growth Factor Receptor-2, in a Transgenic Murine Model of Retinoblastoma. *Open Ophthalmol J.* **2008**; 2: 62–67.

71. **Sulpice E, Plouët J, Bergé M, Allanic D, Tobelem G, Merkulova-Rainon T.** Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood.* **2008**; 111(4):2036-45.
72. **Yuan HT, Suri C, Yancopoulos GD, Woolf AS.** Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and the Tie-2 receptor tyrosine kinase during mouse kidney maturation. *J Am Soc Nephrol.* **1999**; 10(8):1722-36.
73. **Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD.** New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* **1999**; 18(38):5356-62.
74. **Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* **1997**; 277(5322):55-60.
75. **Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, Wiegand SJ, Zabski S, Yancopoulos GD, Grumet M.** Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest.* **2000**; 80(6):837-49.
76. **Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD.** Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* **1996**; 87(7):1161-9.
77. **Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.** Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* **1997**; 277(5322):55-60.
78. **Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD.** Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* **1998**; 282(5388):468-71.
79. **Nugent MA, Iozzo RV.** Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* **2000**; 32(2):115-20.
80. **Wang YJ, Shahrokh Z, Vemuri S, Eberlein G, Beylin I, Busch M.** Characterization, Stability, and Formulations of Basic Fibroblast Growth Factor. New York: Plenum Press, **1996**; 141-180.
81. **Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB.** Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* **1997**; 18(1):26-45.
82. **Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J.** Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol.* **2000**; 32(3):263-7.
83. **Claus P, Werner S, Timmer M, Grothe C.** Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* **2004**; 360(3):117-120.
84. **P. Bagavandoss, J.W. Wilks.** Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem.* **1990**; 170: 867-872.

85. **Taylor S, Folkman J.** Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature*. **1982**; 297(5864):307-12.
86. **O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J.** Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. **1994**; 79(2):315-28.
87. **O'Reilly MS<sup>1</sup>, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J.** Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. **1997**; 88(2):277-85.
88. **Friedman SL.** Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. **2008**; 134(6):1655-69.
89. **Parola M, Marra F, Pinzani M.** Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med*. **2008**; 29(1-2):58-66.
90. **Novo E, Parola M.** Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. **2008**; 1(1):5.
91. **Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E.** Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl4-treated rats. *J Hepatol*. **2000**; 33(4):555-63.
92. **Semela D, Dufour JF.** Angiogenesis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. **2004**; 41(5):864-80.
93. **Semenza GL.** Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med*. **2001**; 7(8):345-50.
94. **Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO.** Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int*. **2009**; 29(7):1010-21.
95. **Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O.** Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. **2002**; 35(5):1010-21.
96. **Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD.** The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*. **1997**; 11(6):457-65.
97. **Mauria A.** O'Brien DVM and Rebecca Kirby DVM, DACVIM, DACVECC. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Vet Emerg Crit Care* **2008**; 18(6):572- 585.
98. **Cohen JJ.** Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AA-AA-I)* **1998**; 1: 1-19.
99. **Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E.** Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern Ars*. **2008**; 36(2): 120-130.
100. **Thompson CB.** Apoptosis. In Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers. **1999**.
101. **Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. **2007**; 35(4):495-516.
102. **Samuilov VD, Oleskin AV, Lagunova EM.** *Programmed cell death. Biochemistry (Moscow)*. **2000**; 65(8): 873–887.

103. **Phill Dash.** Apoptosis. Basic Medical Sciences, St. George' s, University of London 1-6.  
Erişim: <http://www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash>
104. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**; 2(1):91-95.
105. **Perl M, Chung CS, Ayala A.** Apoptosis. *Crit Care Med*, **2005**; 33(12):526-529.
106. **Ziegler U, Groscurth P.** Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. **2004**; 19: 124-8.
107. **Bai J, Odin JA.** Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmun Rev*. **2003**; 2(1):36-42.
108. **Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S.** Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature*. **2002**; 417(6885):182-7.
109. **Kamata H, Hirata H.** Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal*. **1999**;11(1):1-14.
110. **Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF.** Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol*. **1994**;125(2):403-15.
111. **Power C, Fanning N, Redmond HP.** Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock*. **2002**;18(3):197-211.
112. **Çalışkan M.** Apoptosis: Programlanmış Hücre Ölümleri. *Turk J Zool*, **2000**; 24: 31-35.
113. **Ulukaya E.** Apoptozis Ders Notları. **2003**;1-19. Erişim: [www20.uludag.edu.tr/~eulukaya](http://www20.uludag.edu.tr/~eulukaya).
114. **Oppenheim RW, Prevet D, Tytell M, Homma S.** Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol*. **1990**;138(1):104-13.
115. **John C. Reed.** Mechanisms of Apoptosis. *Am J Pathol*. **2000**; 157(5): 1415–1430.
116. **Hengartner MO.** The biochemistry of apoptosis. *Nature*. **2000**;407(6805):770-6.
117. **Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D.** Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepatitis*, **2003**; 10: 335-342.
118. **Kaufmann SH, Gores GJ.** Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays*. **2000**; 22(11):1007-17.
119. **Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G.** Apoptosis: target of cancer therapy. *Clin Cancer Res*. **2002**; 8(7):2024-34.
120. **Padanilam BJ.** Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. **2003**; 284(4):F608-27.
121. **Grenet J, Teitz T, Wei T, Valentine V, Kidd VJ.** Structure and chromosome localization of the human CASP8 gene. *Gene*, **1999**; 226(2): 225-32.
122. **Watt W, Koeplinger KA, Mildner AM, Heinrichson RL, Tomasselli AG, Watenpaugh KD.** The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure*, **1999**; 7(9): 1135-43.
123. **Los M, Stroh C, Jänicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K.** Caspases: more than just killers? *Trends Immunol*. **2001**; 22(1):31-4.

124. **Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, Ruchaud S, Samejima K, Earnshaw WC.** Apoptosis-associated caspase activation assays. *Elsevier*, **2008**; 44: 262–272.
125. **Gül OE.** Karaciğer Siroz Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda TGF- $\beta$  Tip 1 Reseptör Kinaz İnhibitörü, SB431542'nin Apoptozis Üzerine Etkisi. Yüksek lisans tezi, Mersin üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2012**.
126. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, **1997**; 326:1-16.
127. **Budd RC.** Activation induced cell death. *Curr Opin Immunol*. **2001**; 13: 356-362.
128. **Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM.** Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. **2001**; 410(6828):549-54.
129. **Shiraki K, Takase K, Nakano T.** The emerging role of caspase inhibitors in gastrointestinal cancers. *J Gastroenterol*. **2002**; 37(5):323-31.
130. **Fernando P, Megeney LA.** Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken to the extreme? *FASEB J*. **2007**; 21(1):8-17. Epub 2006 Nov 8.
131. **Jin Z, El-Deiry WS.** Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. **2005**; 4(2):139-63.
132. **Sarioğlu S, Ataman Ş.** Apoptoz. *T Klin FTR*, **2003**; 3: 37-44.
133. **Grutkoski PSCC, Albina J, Biffi W,** et al. Apoptosis in the critically ill In: Fink MP, Vincent JL, Kochanek PM, eds. *Textbook of critical care*, 5th ed. **2005**; 195-201.
134. **Chinnaiyan AM.** The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*. **1999**; 1(1):5-15.
135. **Minn AJ, Vélez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, Fill M, Thompson CB.** Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*. **1997**; 385(6614):353-7.
136. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X.** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. **1998**; 94(4):481-90.
137. **Ruffolo SC, Breckenridge DG, Nguyen M, Goping IS, Gross A, Korsmeyer SJ, Li H, Yuan J, Shore GC.** BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell Death Differ*. **2000**; 7(11):1101-8.
138. **Erdoğan BB, Uzaslan EK.** Apoptozis Mekanizmaları: Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. *Türkiye Klinikleri Arch Lung* **2003**; 4(3):165-74.
139. **Miura Y, Koyanagi Y.** Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev Med Virol*. **2005**; 15(3):169-78.
140. **Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.** Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. **2012**; 5(1):9-19.
141. **Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y.** The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci*. **2015**; 16(11): 26087–26124.

142. **Eken A. Rat ve Kan Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri.** Journal of clinical and analytical medicine, 69-73
143. **Dede F, Demir M, Şener D, Bukan N, Köş M, Arhan M, Sezer K, Eskioğlu E.** *Karaciğer Sirozlu Hastalarda Oksidatif Stres Belirteçleri. Tepecik Eğit Hast Derg.* **2011;** 21 (1):5-11.
144. **Noori S.** An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. Open Access. **2012;** 1(8):3-9.
145. **Yerer MB, Aydoğan S.** Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, **2000;** 9(1):49-53.
146. **Özcan A, Atakişi E.** Apoptosisin Biyokimyasal Önemi. Kafkas Uni Vet Fak Derg. **2003;** 9(1):95-100.
147. **Kannan K, Jain SK.** Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology. **2000;** 7(3):153-163.
148. **Beutler E.** Red Cell Metabolism. 2<sup>nd</sup> Ed. Grune & Stratton. New York. **1995;** 74-76,131-132.
149. **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for Lipid Peroxidase in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem*, **1979;** 351-358.
150. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall JR.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **1961;** 193: 265-275.
151. **Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H,** Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol.* **1995;** 22(6):696-9.
152. **Canacankatan N.** Karaciğer Tümöründe Antioksidan Sistem ve Kolşisinin Etkisi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2000.**
153. **Görür A.** Hepatosellüler karsinomda apoptozis mekanizması ve bazı benzimidazol türevlerinin hepatosellüler karsinom üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2010.**
154. **Lee SH, Kim JH, Kim IS, Chae JM.** Morphological Changes of Hepatic Microcirculation in N-diethylnitrosamine Induced Cirrhotic Rat Liver. *Korean J Pathol*, **1995;** 29:197-204.
155. **Finnberg N, Silins I, Stenius U, Hogberg J.** Characterising The Role of MDM2 in Diethylnitrosamine Induced Acute Liver Damage and Development of Pre-Neoplastic Lesions. *Carcinogenesis*, **2004;** 25: 113-122.
156. **Bona S, Moreira AJ, Rodrigues GR, Cerski CT, da Silveira TR, Marroni CA, Marroni NP.** Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study. *Protoplasma.* **2015;** 252(3):825-33.
157. **Kang Z, Zhu H, Jiang W, Zhang S.** Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **2013;** 113(4):221-7.
158. **Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002;** 99(18):11946-50.
159. **Hao T, Rockwell P.** Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* **2013;** 63: 421-31.

160. **Tong Q, Zheng L, Li B, Wang D, Huang C, Matuschak GM, Li D.** Hypoxia-induced mitogenic factor enhances angiogenesis by promoting proliferation and migration of endothelial cells. *Exp Cell Res.* **2006**; 312(18):3559-69.
161. **Sun BH, Zhang J, Wang BJ, Zhao XP, Wang YK, Yu ZQ, Yang DL, Hao LJ.** Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21(WAF1) expression and hepatic apoptosis. *World J Gastroenterol.* **2000**; 6(3): 356-360.
162. **Bantel H, Lügering A, Heideman J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg C, Manns M, Schulze-Osthoff K.** Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. *Hepatology.* **2004**; 40: 1078–1087.
163. **Li CP, Li JH, He SY, Li P, Zhong XL,** Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Genet Mol Res.* **2014**;13(2):3991-9.
164. **Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A.** Human hepatitis C virüs NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NFkB. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2001**; 98: 9599-9604.
165. **Maeda S, Kamata H, Luo JL.** IKK $\alpha$  couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* **2005**; 121: 977–90.
166. **Bansal AK, Bansal M, Soni G, Bhatnagar D.** Modulation of N-nitrosodiethylamine (NDEA) induced oxidative stress by vitamin E in rat erythrocytes. *Hum Exp Toxicol.* **2005**; 24(6):297-302.
167. **Karahan İ, Yılmaz S.** Ratlarda bazı nitrosoaminlerin düşük miktarda-uzun süreli verilmesinin kan, karaciğer ve böbreklerde oksidatif stres üzerine etkileri. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* **2006**; 20(1): 73-78.
168. **Meister A, Anderson ME.** Glutathione. *Annual Review of Biochemistry.* **1983**; 52: 711-760.
169. **Kang Z, Jiang W, Luan H, Zhao F, Zhang S.** Cornin induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signaling pathway. *Food Chem Toxicol.* **2013**; 58:340-6.
170. **Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M.** Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit.* **2005**;11(11):RA337-45.
171. **Domitrović R, Potočnjak I,** A comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives. *Arch Toxicol.* **2016**; 90(1):39-79.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

10.07.1985 yılında Göksun / Kahramanmaraş' ta doğdu. İlköğrenimini Kahramanmaraş Göksun Yavuz Selim İlkokulu, orta öğrenimini Kahramanmaraş Göksun İmam Hatip Ortaokulu, lise öğrenimini Kahramanmaraş Göksun Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 2004 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı. 2010 yılından bu yana aynı bölümde Yüksek Lisansa devam etmektedir.