

**T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA %70 HEPATEKTOMİ SONRASI
ANTİANJİOJENİK CEVAP VE BUNUN REJENERASYON
VE ANJİOGENEZ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2008

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA %70 HEPATEKTOMİ SONRASI
ANTIANGİJENİK CEVAP VE BUNUN REJENERASYON
VE ANJİOGENEZ İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Osman ABBASOĞLU**

**ANKARA
2008**

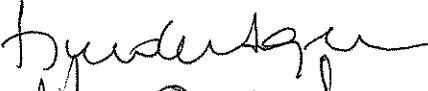
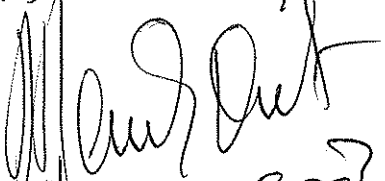
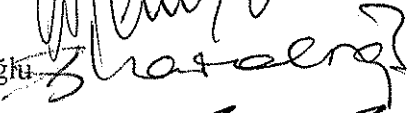

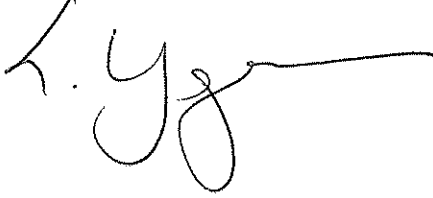


HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı'na

Dr. Ahmet Bülent Doğrul'un 28 Nisan 2008 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı 'SİÇANLARDA %70 HEPATEKTOMİ SONRASI ANTİANJİOJENİK AKTİVİTE VE BUNUN REJENERASYON VE ANJİOGENEZ İLE İLİŞKİSİ' başlıklı çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof.Dr. İskender Sayek 
Üye Prof.Dr. Demirali Onat 
Üye Prof.Dr. Erhan Hamaloğlu 
Üye Prof. Dr. Ataç Baykal 
Üye Doç Dr. Kaya Yorgancı 

ONAY

Bu tez, Tababet/Tıp'ta Uzmanlık Tüzüğü'nün ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Serhat Ünal
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında gösterdikleri destek ve yardımlardan dolayı başta Prof. Dr. Zafer Öner ve Prof. Dr. Osman Abbasoğlu olmak üzere Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerimize, deney protokolünün yazıldığı ilk günden, tezimi tamamladığım güne kadar bilgi ve tecrübesini esirgemeyen Dr. Tamer Çolakoğlu'na, Patoloji Anabilim Dalından Dr. Kemal Kösemehmetoğlu ve Prof. Dr. Gökhan Gedikoğlu'na, PCR laboratuvarını hizmetimize sunan Prof. Dr. Ömer Kalaycı ve Biolog Esra Birgen'e, istatistiksel değerlendirmelerin yapılması hususunda destek olan Dr. Mutlu Hayran'a, PCR sonuçlarının yorumlanmasında büyük emek veren Bilkent Üniversitesi Genetik Bölümünden sayın Elif Yaman'a, Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı bütün çalışanlarına ve çalışmanın finansal desteğini sağlayan HÜTF Bilimsel Araştırmalar Birimine ve her zaman yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr.Ahmet Bülent DOĞRUL

ÖZET

Doğrul AB. Sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası antianjiyojenik cevap ve bunun rejenerasyon ve anjiogenez ile ilişkisi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Tezi Ankara 2008

Karaciğer rejenerasyonu ile anjiyogenez arasında sıkı bir ilişki vardır. Parsiyel hepatektomi sonrasında, sıçan karaciğerinde önce hepatosit rejenerasyonu, daha sonrasında anjiyogenez oluşmakta ve post-operatif 7-10. günde karaciğer, optimal fonksiyonel hacime ve kitleye ulaşmaktadır. Ancak normal karaciğerde parsiyel hepatektomi sonrası antianjiyojenik yanıtın olup olmadığı, ne zaman ortaya çıktığı ve nasıl seyrettiği bilinmemektedir. Hepatositlerde sentezlendiği bilinen tek kolajen türü kolajen 18'dir. Anjiogenezin arttığı durumlarda kolajen18'den proteolitik olarak üretilen moleküllerin anjiogenezin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası antianjiyojenik yanıtı değerlendirmektir. Bu amaçla %70 hepatektomi sonrası geride kalan karaciğerde rejenerasyon, anjiogenez ve antianjiogenez 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 ve 14. günlerde değerlendirildi. Rejenerasyonun 1. günde, anjiogenezin periportal alanda 3. günde; perisinüzoidal alanda 7. günde zirve değere ulaştığını ve antianjiyojenik yanıtın 5. günde başlayıp 10. günde zirve değere ulaştığını gördük. Sonuç olarak normal karaciğer dokusunda rejenerasyon sürecinde antianjiyojenik yanıtın da olduğu ve bu yanıtın anjiogenezin başlangıcını takiben ortaya çıktığını ve karaciğerin ideal kitleye ulaşması ile birlikte sonlandığı sonucuna ulaştık. Ayrıca %70 hepatektomi sonrası rejenerasyonunu tamamlayan karaciğer dokusunda bu sürecin sona ermesini sağlayan uyarının endotel hücre kaynaklı olmayıp hepatosit kaynaklı olabileceği ve hepatositler tarafından sentezlenen kolajen 18'in bu olaya anjiogenezi engelleyerek öncülük edebileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Kolajen 18, endostatin, karaciğer, antianjiogenezis, rejenerasyon

Destekleyen Kuruluş: HÜTF Bilimsel Araştırmalar Birimi 06 D02 101 004

ABSTRACT

Doğrul AB. Antiangiogenic response in rats after %70 hepatectomy and its relationship with hepatic regeneration and angiogenesis. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in General Surgery, Ankara 2008

There is a close interaction between liver regeneration and angiogenesis. After partial hepatectomy, first hepatocyte regeneration and then angiogenesis occur and liver reaches its optimal functional volume and mass between the postoperative 7th-10th day in rats. Whether antiangiogenic response occurs, when it occurs and how it progresses after partial hepatectomy in normal liver is not known. The only collagen type known to be synthesized by hepatocytes is collagen 18. It is thought that molecules that are produced by proteolytic pathways from collagen 18 play role in the regulation of angiogenesis in conditions where angiogenesis is upregulated. The aim of this study was to evaluate the antiangiogenic response after 70% hepatectomy in rats. For this purpose we determined the regeneration, angiogenic and antiangiogenic activity of the remnant liver on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 and 14 after %70 hepatectomy in rats. Our study showed that regeneration and angiogenesis around periportal and perisinusoidal areas have reached the peak values on day 1, 3 and 7 respectively and antiangiogenic response first occurred on the 5th day and reached its peak value on the 10th day. As a result, we demonstrated that in normal liver, antiangiogenic response is also present during regenerative process and this response ceases when liver reaches its optimal functional volume and mass. Also, we think that the stimulus that causes the cessation of regeneration process comes from hepatocytes instead of endothelial cells and collagen 18 produced by hepatocytes may be the pioneer of this event by means of inhibiting the angiogenesis.

Key Words: Collagen 18, endostatin, liver, antiangiogenesis, regeneration

Supported by Hacettepe University Scientific Research Unit, 06 D02 101 004

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karaciğer Rejenerasyonu	3
2.1.1. Olgun Hepatositlerin Çoğalması	3
2.1.2. Hasarlanma Sonrası Çoğalma	4
2.1.3. Hepatosit Büyüme Faktörü	5
2.1.4. Diğer Büyüme Faktörleri	6
2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Anjiogenez	7
2.2.1. Anjiogenezin Düzenlenmesi	7
2.2.1.1 Bazal membran yıkımı: proteolitik enzimler	7
2.2.1.2 Endotel Hücre Göçü ve Çoğalması	8
2.2.1.3 VEGF	8
2.2.1.4 VEGF tipleri ve reseptörleri	9
2.3. Tümöral Anjiogenez	10
2.3.1. Tümör Gelişiminde Anjiogenezin Rolü	10
2.3.2. Antianjiogenik Ajanlar	11
2.4 Endostatin	12
2.4.1. Tarihçe	12
2.4.2. Kolajen 18 ve Endostatin	13
2.4.3. Endostatinin Antianjiogenik Etkisi ve Klinik Özellikleri	16

3.ARAÇLAR VE YÖNTEM	20
3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü	20
3.2. Anestezi	21
3.3. Cerrahi Teknik	21
3.4. Karaciğer Rejenerasyonunun Belirlenmesi	22
3.5. Anjiogenezin Belirlenmesi	25
3.6. Antianjiogenezin Belirlenmesi	27
3.6.1. RNA İzolasyonu	27
3.6.1.1 Yöntem	27
3.6.2. Komplementer DNA eldesi	28
3.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.6.4. Reverse Transkriptaz PCR	29
3.6.5. PCR Sonuçlarının Sayısal Değere Çevrilmesi	30
3.7. Deney Sonuçlarının Sunulması	31
4.BULGULAR	32
4.1. PCNA Değerleri	32
4.2. Anjiogenez Değerleri	35
4.2.1. Periportal Alandaki Anjiogenez Değerleri	35
4.2.2. Perisinüzoidal Alandaki Anjiogenez Değerleri	38
4.3 Antianjiogenik Aktivite Değerleri	42
5.TARTIŞMA	46
6.SONUÇ	52
7.KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

aa	Aminoasit
C15	Kollajen 15
C18	Kollajen 18
CCl₄	Karbon tetra klorür
(c) DNA	(komplementer) Deoksiribonükleikasit
ESM	Hücre Dışı Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	Gliseraldehid 3-fosfo dehidrogenaz
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
İFN α, β, γ	İnterferon α, β, γ
İL-6-11	İnterlökin 6-11
MMP	Matriks Metallo Proteinazları
MVD	Küçük Damar Dansitesi
NC1	Kollajenöz olmayan
(u)PA	(ürokinaz) Plazmin Aktivatörü
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
(RT) PCR	(Reverse transkriptaz) Polimeraz zincir reaksiyonu
PHF/NFκB	Post hepatectomy factor /nucleer factor kappa B'
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PF-4	Trombosit Faktör-4
PLGF	Plasenta Büyüme Faktörü
STAT-3	Signal transducer and activator of transcription-3
TGF-α	Transforme edici büyüme faktörü- α
TGF-β_1	Transforme edici büyüme faktörü- β_1
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

		SAYFA
Şekil 3.1	Sıçan karaciğerinin sol ve median loblarının serbestleştirilmiş hali	22
Şekil 4.1.	Yüzde yeltmiş hepatektomi sonrası PCNA aktivite indeksinin günlere göre dağılımı	34
Şekil 4.2	PCNA ile %90'dan fazla boyanmış hepatosit çekirdekleri.	34
Şekil 4.3	PCNA ile %5'den az boyanmış hepatosit çekirdekleri	35
Şekil 4.4	Yüzde yeltmiş hepatektomi sonrası periportal alandaki VEGF değerlerinin günlere göre dağılımı	37
Şekil 4.5	Periportal hepatositlerin VEGF ile zayıf boyanması.	38
Şekil 4.6	Yüzde yeltmiş hepatektomi sonrası perisinüzoidal alandaki VEGF değerlerinin günlere göre dağılımı	41
Şekil 4.7	Perisinüzoidal ve perisantral VEGF ile kuvvetli boyanmış hepatositler.	41
Şekil 4.8	Yüzde yeltmiş hepatektomi sonrası antianjiogenik aktivite değerlerinin günlere göre dağılımı	44
Şekil 4.9	Kollajen 18'in RT-PCR yöntemiyle elde edilen ultraviyole görüntüleri.	45
Şekil 5.1	Yüzde yeltmiş hepatektomi sonrası rejenerasyonunu tamamlamış karaciğerin görünümü.	46

TABLULAR DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 3.1. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri ürünlerin büyüklüğü ve <i>annealing</i> dereceleri.	30
Tablo 4.1. Sıçanların sakrifiye edildikleri günlere göre PCNA değerleri % olarak verilmiştir.	32
Tablo 4.2. PCNA değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.	33
Tablo 4.3. Periportal alandaki VEGF immün reaktivitesinin günlere göre değerleri.	36
Tablo 4.4. Periportal VEGF immün reaktivitesinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.	37
Tablo 4.5. Perisinüzoidal alandaki VEGF immün reaktivitesinin günlere göre değerleri.	39
Tablo 4.6. Perisinüzoidal alandaki VEGF değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.	40
Tablo 4.7. Antianjiyogenik aktivite değerlerinin günlere göre dağılımı	42
Tablo 4.8. Antianjiyogenik aktivite değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.	43

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sıçanlarda karaciğer rejenerasyonu ile anjiyogenez arasında yakın bir ilişki vardır. Parsiyel hepatektomi sonrasında önce hepatosit rejenerasyonu, sonrasında anjiyogenez oluşmaktadır ve rezeksiyon sonrası 7-10. günde rejenerasyon, 12-14. günde anjiyogenik cevap tamamen kaybolmaktadır (1). Parsiyel hepatektomi sonrası 7-10. günde ise karaciğer, optimal fonksiyonel hacime ve kitleye ulaşır (2).

İlginçtir ki karaciğer rejenerasyonu patolojik anjiogeneze neden olmamaktadır (3). Rejenere olan karaciğer kaybolan karaciğer kitlesini yerine koymaya çalışırken kontrolden çıkıp büyümeye devam etmemektedir. Uygun kitle ve fonksiyonel hacime ulaşıldığında rejenerasyon sona ermektedir. Rejenerasyonu durduran faktörün endotel hücresi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü rejenere olan karaciğer rezeksiyon öncesi hacime ulaştığında endotel hücre çoğalması azalmakta ve endotel hücre apoptozisinde artış söz konusu olmaktadır (3).

Anjiogenez bir çok fizyolojik olayda gerekli olmasının yanında patolojik bazı olaylara da eşlik etmektedir. Tümör gelişiminin ve metastaz yapabilme yeteneğinin anjiogenez bağımlı bir olay anlaşılmasını takiben antianjiogenik tedavi fikri ortaya atılmıştır (4-6).

Primer tümörün uzaklaştırılmasını takiben sessiz metastazların aktive olması tümör tarafından bazı antianjiogenetik moleküllerin üretiliyor olduğunu düşüncesini doğurmuştur. Fakat sonrasında tümör olmadan da bu moleküllerin endojen olarak mevcut olduğu anlaşılmıştır (7, 8).

C18'in karboksi ucundan proteolitik olarak üretilen endostatin, antianjiogenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş moleküllerden birisidir. C18 karaciğer hepatositlerinde üretilen tek kollajen türüdür (9).

Endostatin ve bazı diğer ajanların tümörün gelişiminde ve metastaz yapmasında antianjiojenik aktiviteleri sayesinde olumsuz etkileri olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (10). Fakat normal karaciğer dokusunda rejenerasyon sürecinde antianjiojenik aktivitenin olup olmadığı, ne zaman ortaya çıktığı ve bunun rejenerasyon ve anjiogenez ile ilişkisi gösterilmemiştir.

Bu çalışma, sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası antianjiojenik aktiviteyi ve bunun rejenerasyon ve anjiogenez ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla tasarlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Karaciğer Rejenerasyonu

Fiziksel ve kimyasal hasarlanmaya karşı rejenerasyon yeteneği olduğu en iyi bilinen organ karaciğerdir (3, 11, 12). Hasara uğramış diğer doku ve organlar kendilerini onarabilirler, fakat karaciğer kaybolan fonksiyonel hacmi de yerine koyabilir. Normal karaciğerde mitoz, hepatositlerin 1/20000'inde görülmektedir (5, 11). Bu çoğalma hızı; karaciğer kitlesini, apoptosizi de dengeleyerek sabit tutmaktadır.

Aslında karaciğer rejenerasyonu doğru bir tanımlama değildir (13). Karaciğer, kitlesini yerine koymak için hiperplazi veya hipertrofiye uğramaktadır (5). Kaybolan karaciğer kitlesini yerine koymak için üç mekanizma tanımlanmıştır: i) Mevcut farklılaşmış hücrelerin çoğalması (proliferasyon), ii) Kök hücrelerin farklılaşması ve çoğalması, iii) Periportal hepatositlerin çoğalması. Hücre kaybını hepatosit çoğalması telafi edemediği takdirde farklılaşmakta olan kök hücrelerinden yeni hepatositler üretilecektir (13). Bu mekanizma da yetersiz olursa veya engellenirse periportal hepatositlerin hipertrofisi söz konusu olacaktır (5).

2.1.1 Olgun Hepatositlerin Çoğalması

Olgun hepatositlerin çoğalma katsayıları oldukça düşüktür. Hepatositlerin %95'i rejenerasyona katılmakta fakat hepatik lobül boyunca çoğalma aynı hızda olmamaktadır (1, 13). Periportal hepatositler daha hızlı çoğalırken hepatik venüllerin çevresinde daha yavaş çoğalma söz konusudur (13). Bu fark portal ven çevresindeki hepatositlerin yaş farkından veya portal ven kaynaklı hepatotrofik faktörlerin konsantrasyonundaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir (5, 11, 14).

2.1.2 Hasarlanma Sonrası oğalma

Olgun hepatositlerin çoğalması, fonksiyonel karaciğer kitlesinin, hepatektomi ve toksinlere veya viral nedenlere bağlı olan kaybı ile uyarılmaktadır (5, 11, 13).

Karaciğer kitlesinin yerine konması sıçan modellerinde 7-10 gün sürmektedir (1, 5, 11). İnsan karaciğerinde bu olay daha uzun sürede olmaktadır. Seri halde yapılan bilgisayarlı tomografi (BT) alışmalarında, rezeksiyon sonrası karaciğerin büyüme hızının ($\text{cm}^3/\text{gün}$) rezeksiyon miktarı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca normal karaciğer dokusunun, hastalıklı karaciğer dokusuna oranla aynı rezeksiyon yüzdelerinde iki kat daha hızlı çoğaldığı gösterilmiştir. Normal karaciğerin zirve karaciğer hacmine ulaşması 1-2 ay sürerken, hastalıklı karaciğerinki 3-4 ay sürmektedir (11).

Karaciğerin bütün hücreleri hücre kaybını takiben proliferere olsalar da ilk sırayı hepatositler almaktadır (13). Karaciğerin %70 rezeksiyonunu takiben hepatositler dakikalar içerisinde hücre siklusuna girmektedir (1, 5, 13). Hepatositler 12-24. saatte hücre siklusunun S fazına girmektedir ve maksimum DNA sentezi 24-48. saatte olmaktadır (1, 11-13, 15). Genç sıçanlarda hepatositlerin %5'i, yaşlı sıçanlarda ise %25'i rejenerasyona katılmamaktadır. Karaciğer rejenerasyonu sürecinde hepatositler 1 veya 2 kez blnmektedirler (13).

İmmünohistokimyasal yöntemle yapılan *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) alışmalarında 36-48 saatler arası rejenerasyonun pik yaptđđı ve 72. saate kadar bazal düzeyinden yüksek olduğu belirtilmiştir (16).

Hepatosit düzeyinde birçok faktör çoğalmayı düzenlerken, fonksiyonel karaciğer kitlesini belirleyen bir diğer parametre karaciğer/vücut kitlesi oranıdır (1, 13). Örneğin, küçük karaciğer transplantasyonu veya karaciğer rezeksiyonu yapılması durumunda önceden belirlenen karaciğer/vücut kitlesi oranı elde

edilinceye kadar rejenerasyon devam etmekte iken büyük karaciğer transplantasyonu yapılması durumunda apoptosiz gerçekleşmektedir (11, 13, 17).

Sınırlı karaciğer rezeksiyonlarında, rejenerasyonda anlamlı bir artış görülmez. Genelde rejenerasyon cevabı %15'den büyük hepatektomilerde ortaya çıkmaktadır (18). Yapılan karaciğer rezeksiyon genişliği arttıkça, rejenerasyonun oranı artmaktadır. Benzer şekilde rejenerasyon süresinde de değişiklik gözlenmektedir (19). Örneğin, %80-90 hepatektomi yapılan hayvanlarda, rejenerasyon 24. saatte artmaya başlar, 36-96. saatlerde maksimuma ulaşır ve 7. günde bazale döner. Yüzde 70 hepatektomilerde, 12. saatte artmaya başlar, 24-48. saatlerde maksimum seviyesine ulaşır ve 5. günde normal seviyesine döner (19).

Hepatositlerin dışında biliyer epitel hücreleri, sinüzoidal endotel hücreleri, küppfer hücreleri ve satelit hücreleri de çoğalmaktadır. Bu hücrelerin çoğalması hepatositlerin çoğalmasından 24 saat sonra gerçekleşmektedir (1).

Hepatosit çoğalmasını birçok faktörün karmaşık etkileşimi belirlemektedir. EGF, TGF- α ve HGF; hepatositlerdeki DNA sentezini uyaran en önemli faktörlerdir (1, 13). TGF- β 1 ve aktivin ise çoğalmanın en önemli inhibitörleridir (5, 15). Bu faktörlerin dışında İL-6, İL-1 ve TNF- α da diğer önemli faktörlerdir (5, 11, 15).

2.1.3 Hepatosit Büyüme Faktörü

Hepatosit büyüme faktörü, hepatosit DNA sentezini invitro ve invivo şartlarda uyaran güçlü bir mitojendir. Epitelyal büyüme faktörü ve TGF- α ile birlikte hücre kültüründe diğer faktörlere ihtiyaç duymadan hepatosit çoğalmasını uyarır (1). Rezeksiyon sonrası 1. saatte serum düzeyi yükselir ve 72. saate kadar yüksek kalır (1). Hepatosit büyüme faktörü reseptörünün fosforilasyonu, c-met, DNA sentezi başlamadan birkaç saat öncesinde gerçekleşir. Maksimum mitojenik etki göstermesi için İL-6 ve TNF- α aracılığıyla *hepatosit priming* olayının

gerçekleşmesi gerekir (3, 8, 11, 20). Hepatosit büyüme faktörü aynı zamanda güçlü bir anjiojenik faktördür. Endotel hücre çoğalmasını, hareketini ve farklılaşmasını artırdığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (20).

2.1.4 Diğer Büyüme Faktörleri

Karaciğer rejenerasyonunda DNA sentezini düzenleyen diğer faktörler EGF, TGF- α ve insülinidir. Rezeksiyon sonrası TGF 3.saatte yükselmeye başlar, 12-24. saate pik yapar ve 48 saat yüksek kalır (11).

Epitelyal büyüme faktörü, tükrük bezleri tarafından üretilen endokrin bir faktördür (1). İnsülin diğer faktörler için ko-mitojen olarak görev yapar fakat tek başına hepatosit çoğalmasını uyaramaz (1, 11).

Tümör Nekrozis Faktör - α nin fonksiyonu küppfer hücrelerinin İL-6 salgılamasına bağlıdır. Rezeksiyon sonrası üretimi 48. saatte pik yapar ve mitokondriden oksijen radikallerinin salınımını sağlayarak hepatosit kültüründe sitotoksik etki gösterir (1, 11).

İnterlökin-6, TNF- α uyarısı altında küppfer ve satelit hücrelerden salınır (1). Rezeksiyon sonrası 24. saatte üretimi pik yapar (1, 11). İL-6, İL-1 ve TNF- α karaciğer rejenerasyonunun erken döneminde iki farklı transkripsiyon faktörünün üretimini uyarır. Bunlar *post hepatectomy factor /nuclear factor kappa B'* (PHF/NF κ B) ve *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT-3) dür (5, 12). Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* gibi erken genlerin transkripsiyonuna yol açar. Bu genlerin delesyonu durumunda hepatosit çoğalmasında azalma veya artmış hücre ölümü söz konusudur (1). Bu durum G1-hücre siklusu düzenleyicisi olan siklin E ve D1 bağımlı kinazların aktivasyonundaki azalma veya gecikmeyle açıklanabilir (5, 11).

2.2 Karaciğer Rejenerasyonu ve Anjiogenez

Anjiogenez, organ gelişimi, yara iyileşmesi ve ovülasyon gibi birçok fizyolojik olay için gerekli bir süreçtir (4, 5, 21). Anjiogenezi uyaran (örn. VEGF, FGF) ve engelleyen (örn. thrombospondin-1, anjiostatin ve endostatin) birçok faktör arasındaki dengeye bağlıdır (22). Düzenlenemeyen anjiogenez neoplastik olmayan endometriyozis, romatoid artrit, psöriazis, hemanjiom gibi hastalıklarda söz konusudur (3, 4, 21, 23). Ayrıca tümör gelişimi ve metastazı da anjiogenez bağımlı olaylardır (4, 5).

2.2.1 Anjiogenezin düzenlenmesi

2.2.1.1 Bazal membran yıkımı: proteolitik enzimler

Yeni kapillerlerin oluşması için mevcut damarların endotel hücrelerinin bazal membranını yıkarak anjiogenezin gerçekleşeceği dokuya doğru ilerlemesi gerekmektedir (4, 24, 25). Bu olay plazmin aktivatörünün (PA) ve matriks metaloproteinazlarının (MMP) işbirliğini gerektirir (4, 25).

Plazmin aktivatör'leri plazminojeni plazmine çeviren proteazlardır. Dokulardaki fibrinolitik aktivite uPA tarafından düzenlenir. Plazmin ekstrasellüler matriksde (ESM) bulunan fibrin, fibronectin, laminin ve proteoglikanlar gibi birçok molekülü parçalar. Ayrıca birçok MMP leri de aktive eder (4).

Matriks Metallo Proteinazları ailesinin en az 16 üyesi vardır. Yapılarına ve ürün duyarlılıklarına göre sınıflandırılır. Kolon, meme, over ve mide gibi birçok kanser türünde MMP aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (4, 26).

2.2.1.2 Endotel Hücre Göçü ve Proliferasyonu

Ekstrasellüler matriks'in proteolitik yıkımını takiben endotel hücreleri bu bölgeden göç etmeye başlarlar. Bunu endotel hücre çoğalması takip eder. Bu olay ESM'den salınan birçok büyüme faktörü tarafından uyarılır.

Anjiogenik faktörler 3 ana gruba ayrılır. 1) Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve anjiopöietinler, (etkileri endotele spesifiktir). 2) Bazı sitokinler ve anjiogenik enzimler (örn. FGF-2), 3) TNF- α ve TGF- α gibi makrofajlardan, endotel hücrelerinden ve tümör hücrelerinden diğer faktörlerin salınımını sağlayarak dolaylı etki gösterenler (15).

Bu faktörlerden en önemlisi VEGF'dir (4, 12, 14, 15, 20).

2.2.1.3 VEGF

Endotel hücre çoğalmasını ve göçünü sağlayan oldukça güçlü bir büyüme faktörüdür. Vasküler geçirgenlik (permeabilite) faktör olarak da bilinir (27-30). Doku faktörü kollajenazlarının üretimini uyarır ve makrofaj göçünü artırır (15). Hepatositlerle endotel hücreleri arasındaki iletişimi sağlar (28).

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçanlarda VEGF üretiminin 24. saatte ortaya çıktığı ve 48-72 saat sonunda tepe yaptığı gösterilmiştir (12, 15). Vasküler endotelial büyüme faktör pozitif hücrelerin çoğunluğu periportal alanda yerleşmiş hepatositlerdir. Fakat sinüzoidal endotel hücrelerinin VEGF reseptör antikoruna ile boyanması 72-120. saatler arasında olmuştur. Bu da çoğalmakta olan hepatositlerden rejenerasyon sırasında salınan VEGF'in endotel çoğalmasını sağladığını göstermiştir (12, 15).

İshikawa ve ark. VEGF mRNA'sının %70 hepatektomi sonrası 3-7. günler arası artış gösterdiğini, immünohistokimyasal olarak da VEGF'in hepatositlerde yine aynı günlerde ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (31). Prolifere olan hepatositlerden salınan VEGF'in sinüzoidal endotel hücre proliferasyonunu sağladığı ileri sürülmüştür (31).

2.2.1.4 VEGF tipleri ve reseptörleri

Bir çok tipi tanımlanmıştır. Bunların başlıcaları plasenta büyüme faktörü (PIGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E'dir (32). Üç farklı reseptörü vardır; VEGF-1 (flt-1), VEGFR-2 (kdr/flk-1) ve VEGFR-3 (flt-4) (5, 7, 26, 28, 32). Bunlar tirozin kinaz reseptörleridir (5, 7, 14, 26-29, 33).

Karaciğer rejenerasyonu esnasında ilk eksprese edilen VEGF reseptörünün flt-1 olduğu, bunun da endotel hücre çoğalmasının başladığı zamanla eş zamanlı olduğu; flk-1 ekspresyonunun ise endotel hücre çoğalmasının tepe yaptığı zamanla eş zamanlı olduğu ve 5 gün yüksek kaldığı gösterilmiştir. Fakat flt-1 ve flk-1'in karaciğer rejenerasyonunda veya endotel hücre çoğalmasında farklı fonksiyonları olup olmadığı gösterilememiştir (23).

Vasküler endotelial büyüme faktör-A, VEGFR-1 ve VEGFR-2'ye bağlanarak aktive edebilir (32, 34). VEGFR-1 daha çok hepatositlerden HGF ve İL-6 salınımını uyarırken, VEGFR-2 endotel hücre çoğalmasında rol alır (32). Tip 1 reseptör spesifik olarak uyarıldığında endotel hücre çoğalması olmadan sadece hepatosit çoğalması olduğu görülmüştür (5, 28). VEGF-A ve VEGF-B normal ve patolojik anjiogenezde rol alırken VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiogenezde görev alır (26, 32).

Vasküler endotelial büyüme faktör'in gösterilmiş ilk fonksiyonu vasküler geçirgenliği artırmasıdır (32). Plazma proteinlerinin damar dışına çıkması endotel hücreleri için fibrinden oluşan bir zemin sağlamaktadır. Arter, ven ve lenfatik damarlar üzerine oldukça mitojenik etkiye sahiptir (21, 31, 32). Matriks Metallo

Proteinazları ve PA'lerinin üretimini de artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca vasküler adhezyon moleküllerinin ve intraselüler adhezyon moleküllerinin endotel hücreleri üzerinde ekspresyonunu sağladığı gösterilmiştir. Dentritik hücrelerin matürasyonu üzerinde olumsuz etki yaparak immün sistemi üzerine olumsuz etki yaptığı düşünülmektedir (5, 34). Monosit kemotaksisini artırdığı ve karbon tetra klorür (CCL₄)'e bağlı gelişen karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir (34). Patolojik anjiogenezden de sorumlu olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (diabetik retinopati, romatoid artrit vb.) (29).

İyotla işaretli rekombinan VEGF kullanılarak yapılan çalışma da VEGF'in birçok dokudaki mikrovasküler yapılara bağlanabileceği gösterilmiştir. Bu bölgelerdeki kapiller yapıların geçirgenlik özelliklerinin az veya çok olmasından etkilenmediği görülmüştür (21).

Anti-VEGF antikoru olan Bevacizumab'ın metastatik kolon kanserinde, meme ve akciğer kanserinde kemoterapiyle birlikte kullanıldığında yaşam süresine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir (30, 32, 35, 36). Tümörün radyoterapiye olan duyarlılığını da artırdığı gösterilmiştir (37). Endostatin ile kombine edildiğinde ise HCC modellerinde daha güçlü etki gösterdiği anlaşılmıştır (38).

2.3 Tümöral anjiogenez

2.3.1 Tümör gelişiminde anjiogenezin rolü

Anjiogenez, normal ve tümöral doku gelişimi için gereklidir (32). Birçok erişkin kişinin vücutlarında birden çok organda anjiogenik olmayan in situ kanser odağı bulunduğu fakat bunların sadece 1/600'ünün anjiogenik fenotipe geçerek tümör oluşturduğu bilinmektedir. Endojen antianjiogenik molekülerin bu değişimi engellediği ve fizyolojik anjiogenez de sınırlandırdığı düşünülmektedir (39).

Anjiogenez, solid tümörlerin gelişimi ve metastaz yapabilmesi için çok önemlidir (7, 22, 24, 32, 40). Tümörün avasküler fazdan vasküler faza geçmesiyle birlikte tümör büyüme hızının 20 kat arttığı gösterilmiştir (6). Avasküler fazda 2mm³'den daha küçük bir halde kaldığı görülmüştür. Vaskülarizasyonu engellenen tümörlerin büyümeden sessiz kaldığı görülmüştür. Tümör dokularındaki mikrodamar yoğunluğunun da prognozla direk ilişkili olduğu gösterilmiştir (6).

Prolifere olan endotel hücreleri, tümör hücrelerinin büyümesi, invazyon yapabilmesi ve yaşamaları için birçok büyüme faktörü üretirler. Yani, anjiogenez büyüyen tümör hücreleri için hem perfüzyon hem de parakrin etki sağlar (25, 30).

Tümöral anjiogenez farklı organlarda değişiklik göstermektedir. Örneğin, insan renal karsinom hücreleri renal kapsüle implante edildiğinde subkütan implantasyondan 10-20 kat daha fazla FGF üretmektedir. Benzer şekilde insan kolon kanseri hücreleri karaciğere implante edildiklerinde subkütan implante edildiklerinden daha az VEGF eksprese etmektedirler (41).

Bu bilgiler ışığında 1970'li yıllarda antianjiogenik tedavi fikri ortaya atılmıştır.

2.3.2 Antianjiogenik ajanlar

Tümör gelişiminin anjiogenez bağımlı bir olay olmasının anlaşılmasıyla birlikte tümör vazkularizasyonunu hedef alan ajanlar geliştirilmeye çalışılmıştır (6, 40).

Vücutta doğal olarak antianjiogenik aktivitesi olduğu bilinen moleküllerin varlığı uzun süredir bilinmektedir. Antianjiogenik faktörlerin etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. Anjiogenezi ve neovaskülarizasyonu engelleyebilecek moleküllerin bulunmasında iki yaklaşım sözkonusudur. 1) Vaskülarizasyonu ve hali hazırda devam eden anjiogenezi azaltan ajanlar 2) Anjiogenez olayında rol aldığı

bilinen mekanizmaları engelleyen ajanlar (örn.anti-VEGF antikorları) (7, 32). Bir başka yaklaşım ise endotel hücre çoğalmasını ve göçünü engelleyecek ajanların bulunmasıdır (TNP 470, β -siklodekstrin, D-penisilamin vs.) (25).

Tümör anjiogenezini inhibe ettiği gösterilmiş en önemli anjiostatik ajanlar anjiostatin ve endostatindir. Tümöral proteolitik aktivite ile endojen olarak plazminojenden ve C18'den üretildiği anlaşılan bu moleküllerin deneysel tümör modellerinde tümöral anjiogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Ayrıca bu moleküllerin sadece güçlü birer antianjiogenik ajan olmaları yanında primer tümörün ve metastazlarının büyümesinde de anjiogenezi artıran ve azaltan moleküler arasındaki dengede de rol alarak etkili olduğu düşünülmektedir (7).

Primer tümörün çıkartılmasını takiben metastatik tümörlerin hızla büyüdüğünün görülmesi üzerine endostatinin başlangıçta tümör tarafından üretildiği düşünülmüştür (42, 43). Bu da anjiogenik bir tümörde neden antianjiogenik molekülün üretileceği sorusunu gündeme getirmiştir. Bunun anjiogenezin ortaya çıkmasıyla üretimi engellenmiş olan molekülün daha sonra üretimi üzerindeki engellenmenin ortadan kalkması veya daha öncesinde antianjiogenik olmayan öncü bir molekülden tümör büyümesine eşlik eden proteolitik aktiviteyle birlikte bu molekülden antianjiogenik bir molekülün üretiliyor olabileceği düşünülmüştür (10).

2.4 Endostatin

2.4.1 Tarihçe

İlk olarak 1997 yılında O'Reilly ve arkadaşları endostatini murin hemanjioendotelioma hücrelerinden izole etmeyi başarmışlardır. Sistemik endostatin tedavisi sonrasında tümöral anjiogenezi neredeyse tama yakın baskıladığı gösterilmiştir (10, 42).

Bu molekülün mikrosekans analizi yapıldığında C18'in karboksi ucuna benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır (10, 39, 44, 45).

Endotel hücre çoğalmasını inhibe eden molekül saflaştırıldıktan sonra 18 aminoaside sahip N-terminal kısmının aslında C18'in nonkolajenöz (NC1) alanının karboksi ucu ile aynı molekül olduğu anlaşılmıştır ve bu moleküle endostatin adını vermişlerdir (10, 42, 45-47).

C18'den endostatinin nasıl bir işlem sonucu meydana geldiği tam olarak bilinmemektedir. C18'in kollajenaz olmayan bölgesindeki alanin-histidin bağının iki basamaklı bir işlemle yıkımı sonucu oluştuğu bilinmektedir. İlk basamağın MMP, ikinci basamağın ise elastaz ailesi tarafından gerçekleştirildiği düşünülmüştür (45, 48). Felbor ve ark. ise tümör hücreleri tarafından salınan katepsin- L'nin endostatin üretiminden sorumlu olduğunu MMP'lerin ise aynı proteolitik yolla üretilen farklı moleküller ürettiğini ileri sürmüşlerdir (45, 49).

2.4.2 Kolajen 18 ve Endostatin

Oh ve arkadaşları 1994 yılında diğer kollajenlerden farklı yapıya sahip ekstrasellüler matriks proteinlerinin bir alt grubu olduğu düşünülen kollajen 18'i (C18) tanımlamışlardır (44).

Kollajen α -1(XVIII)'in nükleotid analizi 10 tane 3'lü helikal yapı içerdiğini ve bu helikal yapıların 3'lü olmayan helikal yapılarla kuşatıldığını göstermiştir (44). İnsan ve fare C18'lerinin amino uçlarındaki farklılığa bağlı 3 varyasyonunun olabileceği fakat karboksi uçlarının ve 3'lü helikal yapılarının aynı olduğu anlaşılmıştır (44, 50).

Hepatositlerde sentezlendiği bilinen tek kolajen türü C18'dir (22). Normal insan karaciğer dokusunda C18'in iki formu sentezlenmektedir (9, 40). Kısa formu

bazal membranlarda bulunurken, uzun formu ise çok büyük oranda karaciğerde bulunmaktadır (40). Kısa ve uzun formunun 2 farklı promoter bölgesi ve amino uçlarında sırasıyla 303 ve 493 aminoasitlik (aa) kolajen yapıda olmayan kısımları mevcuttur. Fakat benzer yapıda olan 301 aa'lık NC1 kısmı ve kolajen yapıda olan ve olmayan karboksi uç kısımları vardır (9, 40, 51, 52).

Uzun formu normal ve tümöral hepatosit hücrelerinde eksprese edilirken, kısa formu primer ve sekonder karaciğer tümörlerinin ekstrasellüler matriksinde bulunduğu ve miyofibroblast ve satelit hücreleri tarafından sentezlendiği insan karaciğer biyopsi örneklerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Aynı çalışmada uzun formunun çözülebilen bir pazma proteini olduğu da gösterilmiştir (51).

Farklı insan dokularında yapılan çalışmada kısa formunun birçok dokuda bulunabildiği, fakat uzun formunun ise en fazla karaciğer sinüzoidlerinde olduğu gösterilmiştir (40). C18'in daha çok perikapiller yerleşimli olmasının anjiogenezin arttığı durumlarda C18'den proteolitik olarak üretilen moleküllerin anjiogenezin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmüştür (52).

C18'in vaskülarizasyonu çok olan karaciğer, akciğer ve böbrek gibi birçok organda bulunduğu ve %90'ının karaciğerde olduğu gösterilmiştir (44, 53, 54).

C18 ve kolajen 15 (C15)'in karboksi uçlarının üçlü helikal kısımlarının benzer olduğu ve helikal olmayan kısımlarının da aminoasit dizilimi açısından %60 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu iki kollajen türünün ekstrasellüler matriksin bir üyesi olduğu ve diğer kollajen türlerinden farklı olduğu düşünülerek multipleksinler (*multiple helix domains and interruptions*) olarak adlandırılmışlardır. (4, 44).

C18'in 38 kDa'lık NC1 kısmının endostatinle, heparine ve fibulin-1 ve fibulin-2 gibi mikrofibrillere bağlanma kapasitesinin aynı olduğu anlaşılmıştır (53).

NC1'in ~50 aa'lık N-terminal, proteazlara hassas ~70 aa'lık menteşe bölgesi ve endostatin olarak nitelendirilen ~180 aa'lık C-terminalinden ibaret olduğu

gösterilmiştir. Mentşe kısmı endojen proteolitiklere hassas kısmıdır. Endostatinin proteolitik yıkımının farklı yollardan olabileceği ve bununda parakrin ve endokrin etki gösterecek farklı endostatinlerin üretimine yol açabileceği belirtilmiştir (4, 46, 53, 55).

Doku ve serumda endostatin benzeri ebatları olan endostatin (22kDa) ile NCI monomeri (38kDa) arasında değişen farklı proteinlerin olduğu ortaya çıkmıştır. İnsan ve fare NC1'inin mentşe kısmında 11 farklı proteolitiklere hassas nokta bulunmuştur. Bu da farklı proteolitik yolların olduğunu düşündürmüştür (53). İmmünohistokimyasal çalışmalarda dokulardaki moleküllerin NC1'e, aort ve dolaşımdaki moleküllerin ise endostatine daha çok benzer olduğu görülmüştür (4, 46).

C18'in NC1 kısmının üçlü-helikol olmayan kısmının farelerde 315 aa, insanlarda 312 aa dizininden oluştuğu ve endostatine denk gelen kısımlarının ise farelerde 130-315. aa ler, insanlarda 129-312. aa ler arası olduğu gösterilmiştir (53). Moleküler ağırlığı ~22 kDa olduğu belirtilmiştir (10, 53).

Normal karaciğerde C18'in ağırlıklı olarak perisinüzoidal aralıkta ve bazal membran alanlarında bulunduğu gösterilmiştir (52). C18'in ana kaynağının hepatositler olduğu daha az oranda endotel hücrelerinde ve bilier epitel hücrelerinde de üretildiği saptanmıştır (22, 50, 54). Sirotik karaciğerde ise aktif fibrozis durumunda miyofibroblast C18 üretimini 13 kat artırdığı, aktif olmayan fibrozis de ise 2 kat artırdığı hepatositlerin ise her iki durumda da C18 üretimini 2 kat artırdığı görülmüştür. Yani normal karaciğerde C18 kaynağının hepatositler olduğu, sirotik karaciğerde ise satellite hücrelerin olduğu ve C18'in bazal membranın yeniden yapılanmasında rol oynadığı sonucuna varılmıştır (22, 54).

Bir başka çalışmada ise akut fibrozisde C18 üretiminin sabit kaldığı, kronik fibrozisde ise artış gösterdiği saptanmıştır (50). Ayrıca HCC hücrelerinde üretiminin

arttığı bunun da tümör endotel hücreleri için çoğalmayı artırabilecek bir rol oynayabileceği düşünülmüştür (50, 51).

Guenther ve ark., kolorektal kanserli hastalarda yaptığı çalışmasında, C18'in endotel hücrelerinde, miyofibroblast ve fibroblastlarda üretildiğini fakat kanser hücresi tarafından üretilmediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada over kanserli hastalarda C18'in hem tümör hem de stromal hücreler tarafından üretildiğini göstermişlerdir (56).

İnsan ve fare C18'lerinin %79 oranında benzer yapıda olduğu ve en fazla benzerliğin son 184 aa'lık kısımlarında olduğu ve bu kısımda C18'den proteolitik olarak salınan 20 kDa ağırlığındaki endostatin olduğu anlaşılmıştır (9, 52).

Tümöral dokuda sirotik dokuya, sirotik dokuda da normal karaciğer dokusuna kıyasla daha fazla C18 üretildiği gösterilmiştir (57). Endostatin düzeyinin normal ve sirotik karaciğerde artan rezeksiyon yüzdeleriyle birlikte arttığı gösterilmiştir (58). Bu da normal karaciğerde hepatektomi sonrası rejenerasyon kapasitesi ile serum endostatin düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Sirotik karaciğerde ise endostatin düzeyinin karaciğer rejenerasyonu ile ilişkisiz olduğu gösterilmiştir (58).

2.4.3 Endostatinin Antianjiyogenik Etkisi ve Klinik Özellikleri

Endostatin 65 farklı tümör tipinde etkili olduğu ve insan genomunda patolojik anjiogenezen sorumlu olanların %12'sini modifiye ettiği gösterilmiştir. Kanser tedavisinde FDA tarafından onaylanan ilk antianjiyogenik moleküldür. Ayrıca ekstrasellüler matriksten köken aldığı anlaşılan ilk antianjiyogenik ajandır. Rekombinan endostatin ilk olarak E.Coli'de üretilmiştir (39, 47).

Endojen antianjiyogenik ajanlardan en geniş spektruma sahip olanı ve en az toksik olanı endostatindir. Hastalara 3.5 yıl hergün uygulandığında bile hiçbir toksik

etki ve direnç gelişmediği görülmüştür. Yara iyileşmesine olumsuz etki yapmadığı gösterilmiştir (4, 47).

Endotel hücre çoğalmasını, göçünü ve tüp formasyonunu engellediği, endotel hücrelerinde apoptosizi artırdığı ayrıca VEGF aracılı vasküler geçirgenlikteki artışı azalttığı bilinmektedir (45, 59). Endotel hücre göçünü bazı tümör tiplerinde proliferen olan endotel hücrelerinde eksprese olan $\alpha_5\beta_1$ integrine bağlanarak yerel kinazların fosforilasyonunu engelleyerek azalttığı gösterilmiştir (4, 39, 59-63).

Endostatinin antianjiojenik etkinliğinin E-selektine bağlanmasına bağlı olabileceği ve ayrıca metalloproteinaz 2, 9 ve 13'ünde aktivitesini engellemekte olduğu düşünülmüştür (64). Endotel hücrelerinde endostatin aracılığıyla oluşan intraselüler sinyalin, endotel hücrelerin çoğalmasıyla ilişkili genleri engellediği anlaşılmıştır. İnsan genomunun %90'ını içeren bir çalışmada endostatine maruz kalınması durumunda bu genlerin %12'sinin insan mikrovasküler endotel hücrelerinde üretiminin arttığı gösterilmiştir (47, 60, 61, 65).

Endostatin NH_2 ucunda 3 histidin ve aspartik asit aracılığıyla bir çinko (Zn) atomu bağlar. Heparine bağlanma özelliği ise 3 boyutlu yapısındaki arjininle ilişkilidir. Endostatinin heparin bağlama özelliği hücre yüzeyi ile ilişkisini sağlamaktadır. NC1 kısmı ise bazal membrandaki laminin ile ilişkilidir. Bu da endostatinin farklı bölgelerinin farklı biyolojik etkileri olabileceği düşüncesini doğurmuştur. Yapılan çalışmalarda endostatinin Zn bağlayan 27 aa'lik kısmının antianjiojenik aktiviteden sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Zn bağlamasının antitümör ve antimigrasyon aktivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (60).

Endostatinin kristal yapısı olması heparin bağlayan kısmının olabileceğini ortaya çıkarmış ve fibronektin ve C18 kaynaklı endostatinin FGF'in heparan sulfat reseptörlerine bağlanmasını engelleyebileceği öne sürülmüştür (4).

Endostatinin, sitotoksik kemoterapötiklerin aksine, yavaş büyüme hızına sahip tümörlerde daha çok etkili olduğu anlaşılmıştır. İntratümöral mikrovasküler yoğunluğu azalttığı gösterilmiştir (47).

Fare serum ve idrarında endostatin düzeyinin 120 ± 12 ng/ml ve 22 ± 13 ng/ml olduğu saptanmıştır. Farenin beyin, iskelet kası, kalp, böbrek, testis ve karaciğerinde ise $0.3-2$ µg/ml oranında artan miktarda olduğu gösterilmiştir (53). Endotel hücre çoğalmasını engelleyici konsantrasyonunun farelerde 3×10^{-9} M veya daha yüksek olduğu gösterilmiştir (55). Doku ve serumdaki endostatin konsantrasyonu arasında fark olması muhtemelen ESM proteinleri ile ilişkili endostatin havuzu olduğu ve proteolitik yıkımı sonucu serum formunun elde edildiği düşünülmüştür (4).

Fare ve insan endostatininin protein yapılarının %86 özdeşlik gösterdiği ve %90'dan fazla benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. İnsan serumunda endostatin olduğu anlaşılması üzerine, ekstrasellüler matriksdeki vasküler yapıların bazal membranlarında bulunan endostatinin parakrin etkisi yanında, endokrin etkisinde olabileceği ileri sürülmüştür (55) .

Endostatin, 10-100 mg/kg/gün doz aralığında kullanıldığında tümörlerin %47 ile % 91 arasında yanıt verdiği görülmüştür (47). Endostatin tedavisine yanıtın bifazik U şeklinde doz-yanıt eğrisi çizdiği görülmüştür. Optimum yanıtın çok düşük ve çok yüksek dozlarda olduğu bildirilmiştir (39).

Down sendromlu hastalarda C18'in 3 kopyası olduğu için, bu kişilerde serum endostatin düzeyi diğer insanlara kıyasla 1.6 ile 2 kat daha fazla olmaktadır. Bu sendromun görüldüğü kişilerde testiküler kanserler ve megakaryositik lösemiler hariç, diğer bütün tümörlerin beklenenin 1/10'undan daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca Diabetes Mellitus insidansı bu kişilerde diğer popülasyonla aynı olmasına rağmen diyabetik retinopatinin hiç görülmediği bildirilmiştir (39).

Endostatin tedavisinin aterosklerotik plak gelişimini %85 oranında engellediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (39).

Deneysel çalışmalarla endostatinin farklı dokularda (subkütan doku, karaciğer ve akciğer) kolon ve renal karsinomun gelişimini engellediği gösterilmiştir (41)

Hepatosellüler karsinomlu (HCC) hastalarda ameliyat öncesi serum endostatin düzeyine bakıldığında yüksek değere sahip hastaların daha uzun yaşam süresine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca VEGF ve FGF gibi anjiyogenik faktör düzeyi ile de doğru ilişkili olduğu anlaşılmıştır (66, 67).

Hepatosellüler karsinomlu'li hastalarda düşük C18 düzeyine sahip hastalarda tümör çapının daha büyük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yüksek mikrovasküler yoğunluğa sahip oldukları da gösterilmiştir. Daha az C18 eksprese eden tümörlerin 2 yıllık rekürrens oranı yüksek olanlarınkinden 2.2 kat daha fazla olmuştur (40).

Başka bir çalışmada ise yüksek endostatin/C18 düzeyi ve VEGF düzeyinin olduğu HCC'li hastalarda yaşam süresinin daha kısa olduğu ve rekürrensle de doğru ilişkili olduğu gösterilmiştir (68).

3. ARAÇLAR VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü

Bu çalışmanın finansal desteği Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından sağlanmıştır (proje no:06 D02 101 004).

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde gerçekleştirilen bu çalışmada, T.C Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Serum Çiftliğinden elde edilen, ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen, standart laboratuvar yemi ile beslenen, 64 adet Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 05.01.2006 tarih, 2005 kayıt ve 2005/72-5 karar numaralı izni alınmıştır.

Deney protokolünde sıçanlar her grupta 8'er sıçan olacak şekilde 8 alt gruba ayrıldı. Gruplar 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14. gün grupları olarak belirlendi.

- Grup 1: Laparotomi sonrası, karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 2: %70 hepatektomi sonrası, 24. saatte kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 3: %70 hepatektomi sonrası, 48. saatte kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 4: %70 hepatektomi sonrası, 72. saatte kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 5: %70 hepatektomi sonrası, 120. saatte kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 6: %70 hepatektomi sonrası, 7.günde kalan karaciğerde C 18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.

- Grup 7: %70 hepatektomi sonrası, 10.günde kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.
- Grup 8: %70 hepatektomi sonrası, 14. günde kalan karaciğerde C18, rejenerasyon ve VEGF düzeyi değerlendirildi.

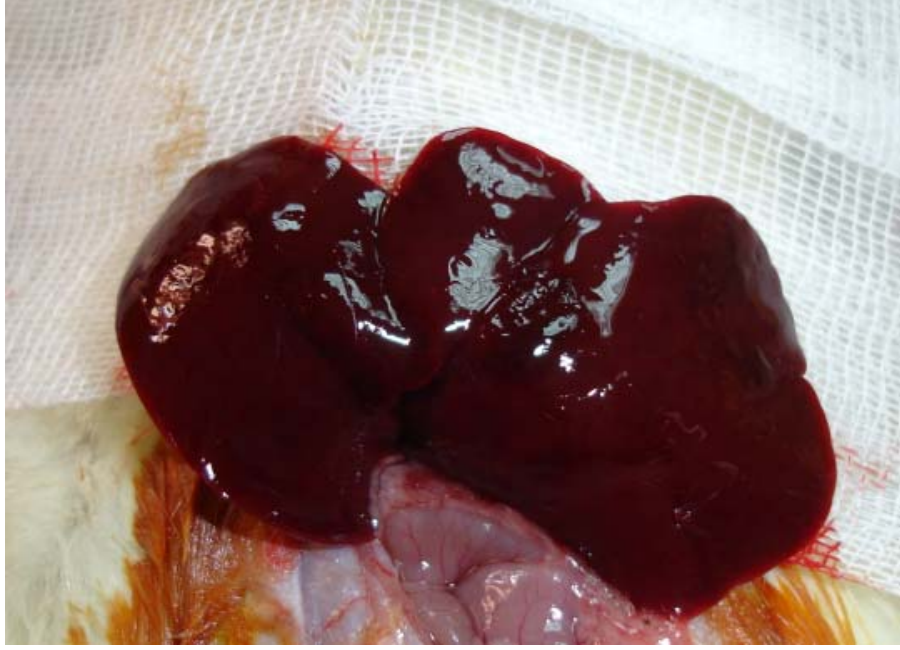
Deney hayvanları oda sıcaklığında, 12 saatlik gündüz/gece döngüsünde tutulmuşlardır. Normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir.

3.2. Anestezi

Tüm cerrahi gruplar için genel anestezi, 5 mg/kg xylazine (Rompun Bayer, Türkiye) ve 30 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar Panker Davis, Türkiye) karışımı intraperitoneal verilerek sağlandı.

3.3. Cerrahi Teknik

Aseptik şartlarda 2 cm'lik orta hat laparatominin ardından, Higgins ve Anderson'un tanımlamış olduğu karaciğer sol anterior ve median loblarının pedikülleri, koroner, sol lateral ve gastrohepatik ligamentler serbestleştirildikten sonra 2/0 ipek ile bağlandı ve rezeksiyon yapıldı (Şekil 3.1) (69). Hepatektomi sonrası geride kalan karaciğer dokusu kanama ve konjesyon açısından kontrol edildi. Karın içine 10 mm'lik %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu verilerek karın orta hattı 3/0 ipek (Merksilk, Ethicon, Jhonson& Jhonson Medical Limited, İngiltere) ile 2 sıra şeklinde kapatıldı. İşlem sonrası sıçanlar etüv aletinde anestezi etkisi ortadan kalkıncaya kadar standart sıcaklıkta tutulmuşlardır.



Şekil 3.1 Sıçan karaciğerinin sol anterior ve median lobunun serbestleştirilmiş hali

3.4 Karaciğer Rejenerasyonunun Belirlenmesi

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçan karaciğerindeki rejenerasyon düzeyi immünohistokimyasal yöntemle PCNA aktivite indeksine bakılarak belirlenmiştir.

Proliferating cell nuclear antigen 36kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. Siklin olarak da bilinir. Hücre siklusunun G1 ve S fazlarında sentezlenir. Deoksiribonükleik asit (DNA) polimeraz için kofaktör görevi görür. Bu proteinin iki formu vardır. Replikasyonda yer almayan çözünür formu ve çözünür olmayan DNA sentezi ile ilişkili formu ki bu formu hücre nükleusunda bulunmaktadır. Deoksiribonükleik asit sentezinin arttığı durumlarda nükleusdaki ekspresyonunun artışı immünohistokimyasal olarak gösterilebilmektedir (16, 70,71).

Sıçan karaciğerleri hepatektomi sonrası 1 gün %10 luk formaldehit solüsyonu içinde bekletildi. Daha sonra en geniş yüzeyleri görülecek şekilde parça alındı. Rutin doku takibi yapılarak parafin bloklar elde edildi.

Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında boyasız kesitler hazırlanarak PCNA immünohistokimyasal yöntemle aşağıda belirtildiği gibi boyanmıştır.

1. Kesitler 80 °C de bir saat deparafinize edildi.
2. Ksilen’de 10-15 dakika ve alkolde 5-10 dakika bekletildi.
3. Distile su ile yıkandı.
4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*).
 - a) %10’luk fosfat tampon solüsyonu (FTS) hazırlandı.
 - b) Mikrodalga fırına dayanıklı plastik şale içine yerleştirildi.
 - c) Üzerine %10’luk *antigen retrieval* solüsyonu konuldu.
 - d) Mikrodalgaya dayanıklı geniş bir kap içine su doldurularak mikrodalga içine yerleştirildi.
 - e) Mikrodalga maksimum güçte çalıştırıldı.
 - f) Şale içindeki solüsyon kaynamaya başladığında mikrodalga fırın kapatıldı.
 - g) Daha sonra fırın %50 güç azaltılarak 30 saniye çalıştırılıp 5 saniye beklendi ve aynı işleme 15 dakika devam edildi.
 - h) 15 dakika sonunda şale mikrodalga içinden çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

i) Daha sonra birkaç defa distile su ile çalkalandıktan sonra FTS içine alındı.

5. Distile su ile tekrar yıkandı.

6. Yüzde 3'lük H₂O₂ ile 10 dakika Peroksidaz blokajı (Polyvalent UltraTek Lab Pack Kit, ScyTek Laboratuvarı, Logan, Utah, ABD) yapıldı.

7. Distile su ile yıkandı.

8. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

9. Takara PCNA Ab-1 antikoruna damlatıldı (NeoMarkers' (Cat. #MS-106-P), Labvision Corporation, Fremont, California, ABD) ve 30 dakika kadar bekletildi.

10. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

11. DAKO Üniversal LSAB 300 İmmünohistokimya kitinde (İHK) (DAKO Cytomation, Glostrup, Danimarka) 10 dakika bekletildi.

12. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

13. DAKO Üniversal İHK kitinde 10 dakika bekletildi.

14. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

15. DAKO Üniversal İHK Kitindeki kromojende 10 dakika bekletildi.

16. Musluk suyu ile yıkandı.

17. Hematoksilen ile karşı boyama yapıldı.

18. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp kapatıldı.

Değerlendirme, PCNA immün reaktivitesinde nükleer boyanma anlamlı olarak kabul edilmiş ve nekroz alanlarından uzakta seçilmiş 1000 hepatosit sayılmıştır. PCNA indeksi 1000 hücre sayımı sonrası nükleer immünreaksiyon gösteren hücrelerin yüzdesi belirlenerek yapılmıştır.

3.5 Anjiogenezin Belirlenmesi

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçanlarda anjiogenez periportal ve perisinüzoidal alandaki hepatositlerde immünohistokimyasal yolla VEGF aktivitesine bakılarak değerlendirilmiştir.

Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında boyasız kesitler hazırlanarak VEGF immünohistokimyasal yöntemle aşağıda belirtildiği gibi boyanmıştır.

1. Kesitler 80 °C de bir saat deparafinize edildi.
2. Ksilen’de 10-15 dakika ve alkolde 5-10 dakika bekletildi.
3. Distile su ile yıkandı.
4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*).
 - a) %10’luk fosfat tampon solüsyonu (FTS) hazırlandı
 - b) Mikrodalga fırına dayanıklı plastik şale içine yerleştirildi.
 - c) Üzerine %10’luk *antigen retrieval* solüsyonu konuldu.
 - d) Mikrodalgaya dayanıklı geniş bir kap içine su doldurularak mikrodalga içine yerleştirildi.
 - e) Mikrodalga maksimum güçte çalıştırıldı.

f) Şale içindeki solüsyon kaynamaya başladığında mikrodalga fırın kapatıldı.

g) Daha sonra fırın %50 güç azaltılarak 30 saniye çalıştırılıp 5 saniye beklendi ve aynı işleme 15 dakika devam edildi.

h) 15 dakika sonunda şale mikrodalga içinden çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

i) Daha sonra birkaç defa su distile su ile çalkalandıktan sonra STS içine alındı.

5. Distile su ile tekrar yıkandı.

6. Yüzde 3'lük H₂O₂ ile 10 dakika Peroksidaz blokajı (Polyvalent UltraTek Lab Pack Kit, ScyTek Laboratuvarı, Logan, Utah, ABD) yapıldı.

7. Distile su ile yıkandı.

8. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

9. Takara VEGF antikoruna damlatıldı (NeoMarkers' VEGF Ab-1 (Cat. #RB-222-R7), Labvision Corporation, Fremont, California, ABD) ve 30 dakika kadar bekletildi.

10. FTS de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

11. DAKO Universal LSAB 300 İmmünohistokimya kitinde (İHK) (DAKO Cytomation, Glostrup, Danimarka) 10 dakika bekletildi.

12. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

13. DAKO Universal İHK kitinde 10 dakika bekletildi.

14. FTS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

15. DAKO Universal İHK Kitindeki kromojende 10 dakika bekletildi.

16. Musluk suyu ile yıkandı.

17. Hematoksilen ile karşı boyama yapıldı.

18. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp kapatıldı.

Değerlendirme; VEGF immünohistokimyasal boyanması periportal ve perisinüzoidal olarak iki farklı alanda değerlendirildi. Periportal alanda portal alanı çevreleyen VEGF pozitif hücreler tek sıra oluşturduğunda +1, 2 sıra oluşturduğunda +2 ve daha fazla sıralanma gösterdiğinde +3 olarak değerlendirildi. Perisinüzoidal hücrelerin pozitifliği ise benzer şekilde +1, +2, +3 olarak değerlendirildi.

3.6 Antianjiogenezin belirlenmesi

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçan karaciğerindeki antianjiogenik aktivite RT-PCR yöntemi ile C18 düzeyine bakılarak belirlenmiştir.

3.6.1 RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için RNA izolasyon kiti (RNAaz, QIAGEN, Valensia, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6.1.1 Yöntem

Homojenizasyon: 215-220 mg doku örneği alınarak sıvı nitrojen içinde havanda homojenize edildi.

1- Homojenize edilmiş örnekler, kullanılmadan önce içine %1 β -Merkaptoetanol ilave edilmiş 350 μ l RLT tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalandı.

2-Üzerine eşit miktarda steril DEPC su ile sulandırılmış %70 etanol ilave edildi ve 2 ml'lik toplama tüpü üzerine yerleştirilmiş olan kolon üzerine pipetlendi.

3-Tüpler 13000 rpm'de 30 sn santrüfuj edildi.

4-Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine 700 µl RWL yıkama tamponu ilave edildi.

5-Tüpler 13000 rpm de 30 sn santrifuj edildi.

6-Kolon yeni bir toplama tüpü üzerine yerleştirildi ve kolona 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi ve 13000 rpm'de 30 sn santrifuj edildi.

7- Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine yine 500 µl RPE solüsyonu ilave edildi.

8-Tüpler 13000 rpm de 2 dakika santrifüj edildi.

9- Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve üzerine hiç birşey ilave edilmeden yine 13000 rpm'de 1dakika santrifüj edildi.

7-Kolon steril 1.5 ml ependorf tüp üzerine alındı ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su ilave edilerek 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C de saklandı.

3.6.2 Komplementer DNA Eldesi

500-1000 ng RNA örneği Speed Vac yardımı ile kurutulduktan sonra ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, ABD) kullanılarak komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürüldü.

Kurutulan RNA örneklerinin üzerine 1 µl mRNA'ların poly A kuyruğuna eşlenik olan oligo dT ve 4µl nükleaz içermeyen su ilave edildi. Tüpler 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek katlanmış olan RNA zincirlerinin açılması ve oligo dT nin zincirdeki eşleniği olan bölgeye ulaşması sağlandı. İnkübasyon sonunda örnekler önce 5 dakika buzlu suda daha sonrada buzda bekletilerek primerin (oligo dT) kalıba yapışması sağlandı. Sonra aşağıda belirtildiği şekilde bir karışım hazırlandıktan sonra tüpler önce 25°C'de 5 dakika ve daha sonra 42°C'de 1 saat inkübe edilerek komplementer DNA'ların oluşumu sağlandı. Reaksiyon sonunda Reverse Transkriptaz enziminin denature edilebilmesi için tüpler 70°C'de 10 dakika inkübe edildi.

5µl	Primer ve RNA karışımı
4µl	5X Reaksiyon tamponu
1µl	dNTP karışımı
1.5µl	MgCl ₂
0.5µl	RNAaz inhibitörü
1µl	Reverse Transkriptaz enzimi
7µl	Nükleaz içermeyen su
20µl	Toplam reaksiyon karışımı

3.6.3 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) dizisi bilinen bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir.

PCR'in prensibi; tekrarlanan 3 basamağa dayanır.

1. Denatürasyon: Bu basamakta PCR reaksiyonu içinde yer alan çift zincirli kalıp DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanır.

2. Primerlerin yapışması (*annealing*) : Bu basamakta birbirinden ayrılmış DNA zincirlerine primerlerin 55-60 °C'da bağlanması gerçekleştirilir.

3. Zincir uzaması-polimerizasyon (*extention*) : Zincir uzaması Taq polimerazın aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75 °C arasında gerçekleştirilir.

3.6.4 Revers Transkriptaz-PCR

RNA'yı kalıp olarak kullanan bir DNA polimeraz kullanılarak daha sonra PCR reaksiyonunda işlev görecektir olan cDNA'lar sentezlenir. Hücre veya dokularda ifade edilen özgül dizilerin belirlenmesinde oldukça hassas bir yöntemdir.

Elde edilen cDNAlar kullanılarak öncelikle hücredeki ekspresyon miktarı değişmeyen sürekli olarak ifade edilen *house-keeping* genlerden ikisi β -actin ve gliseraldehid 3-fosfo dehidrogenaz (GAPDH) kullanılarak örnekler arasında cDNA miktarları eşitlenerek daha sonra belirlenen miktarlarda cDNAlar kullanılarak C18 geni amplifiye edildi. Birbuçuk mM $MgCl_2$, 10 pmol direkt ve ters yöndeki primerler, 250 μ M dNTP karışımı ve 1,5 U Taq polimeraz (Promega Corporation, Madison, ABD) içeren PCR karışımı kullanılarak cDNAlar çoğaltıldı. Oluşan PCR ürünleri etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde yürütüldü ve ultraviyole ışığında görüntülendi. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri ürünlerin büyüklüğü ve *annealing* dereceleri Tablo 3.1 de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 PCR reaksiyonlarında kullanılan primerlerin dizileri ürünlerin büyüklüğü ve *annealing* dereceleri.

Primer Dizisi	PCR Ürünü büyüklüğü	Annealing derecesi
Rat B-actin F 5'-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' Rat B-actin R 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'	764bp	58°C
Rat GAPDH F 5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3' Rat GAPDH R 5'-GTAGCCATATTCATTGTCATA-3'	500bp	56°C
Rat Col18 F 5'-GGCGAGCAGATGACATCTT-3' Rat Col18 R 5'-CGCCGGAGAACAGGGTGT-3'	413bp	58°C

3.6.5 PCR Sonuçlarının Sayısal Değere Çevrilmesi

Elde edilen ultraviyole görüntüler BIO-PROFİL V99 Analyser programı kullanılarak sayısal değerler elde edildi. Zemin aktivitesi ihmal edilerek band hacmi ölçüldü, karşılık gelen β -actin ve GAPDH hacimlerine oranı sayısal değer olarak belirlendi.

3.7 Deney Sonuçlarının Sunulması

Proliferating cell nuclear antigen, VEGF ve C18 değerlerinin normal dağılıma uygunluğu incelenmiş ve normal dağılım göstermedikleri bulunmuştur.

Sakrifikasyon günleri arasında ölçülen parametreler arasındaki farklar istatistiksel olarak Kruskal-Wallis (KW) testi kullanılarak hesaplanmıştır. Anlamlı fark bulunan parametreler için başlangıca göre ikişerli Mann-Whitney U testleri (MWU) yapılmıştır. Başlangıca göre değişimler temel hipotez olarak belirlenmiş ve ilk değişimin olduğu gün istatistiksel anlamlılığın 0.05 değerinin altına indiği gün olarak, bazal değere geri dönen gün olarak ise istatistiksel anlamlılığın 0.10 üzerine çıktığı ilk gün olarak belirlenmiştir. En fazla fark görülen gün başlangıca göre fark olduğu belirlenen günler içinde tip-1 hatanın minimum olduğu gün olarak belirlenmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için düzeltme uygulanmamıştır.

4.BULGULAR

4.1 PCNA değerleri

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçan karaciğerindeki rejenerasyon değerleri PCNA immüno reaktivitesi olarak (%) belirlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Sıçanların sakrifiye edildikleri günlere göre PCNA değerleri % olarak verilmiştir.

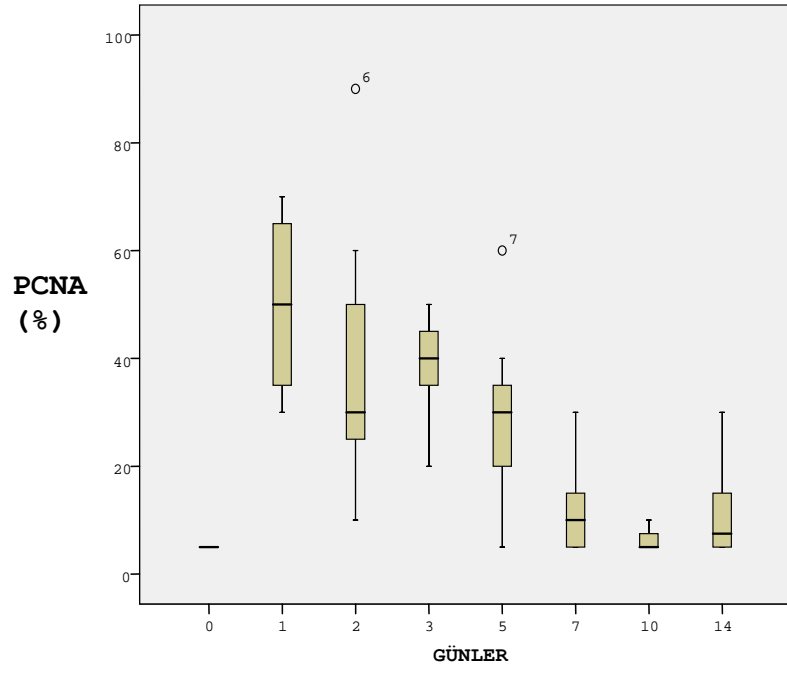
SIRA	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
1	5	70	20	40	5	5	5	5
2	5	50	40	40	20	5	5	5
3	5	50	10	50	30	10	5	10
4	5	40	30	40	30	10	5	30
5	5	60	30	50	40	30	10	5
6	5	30	90	30	20	20	10	20
7	5	70	30	20	60	10	5	10
8	5	30	60	40	30	5	5	5

Herbir grubun PCNA değerlerinin ortalama değerleri, ortanca değerleri, %25-75 değer aralığı (IQR: interquartery ratio) Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Grupların PCNA değerlerindeki değişikliklerin anlamlı olup olmadığı 0. gün değerleriyle karşılaştırılmıştır. P değerinin 0.05’den küçük olduğu ilk gün ilk anlamlı yükselme, 0.1’den büyük olduğu ilk gün ise ilk anlamlı düşüş olarak kabul edilmiştir. Rejenerasyondaki ilk anlamlı değişiklik 1. günde gerçekleşmiştir (p: 0.003). Rejenerasyonun 10. gün ile 0. gün değerleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır (p:0,143). En yüksek ortalama değere ise 1. günde ulaşılmıştır (Tablo 4.2).

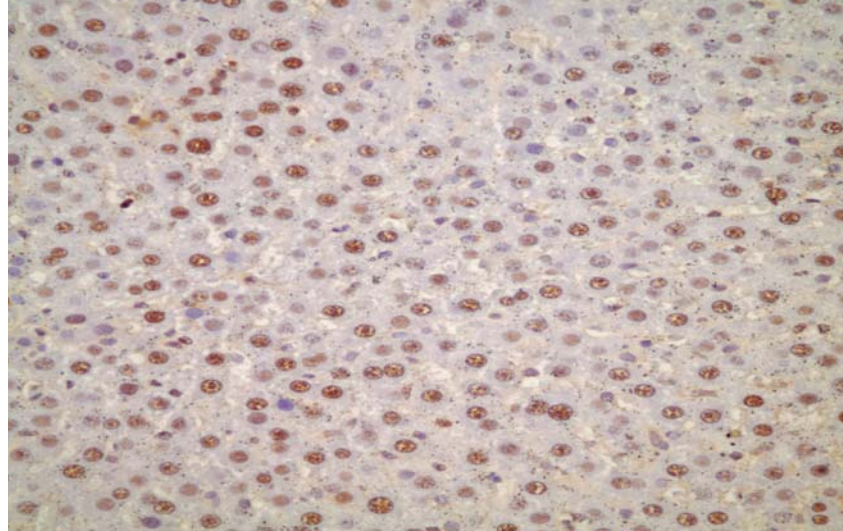
Rejenerasyon 1. günde zirve değerine ulaşmış, 2., 3., 5. ve 7. günlerde giderek azalmış ve 10. günde bazal değerine dönmüştür. Fakat 2. ve 7. günler arasındaki değerleri de 0. güne kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3).

Tablo 4.2 PCNA değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.

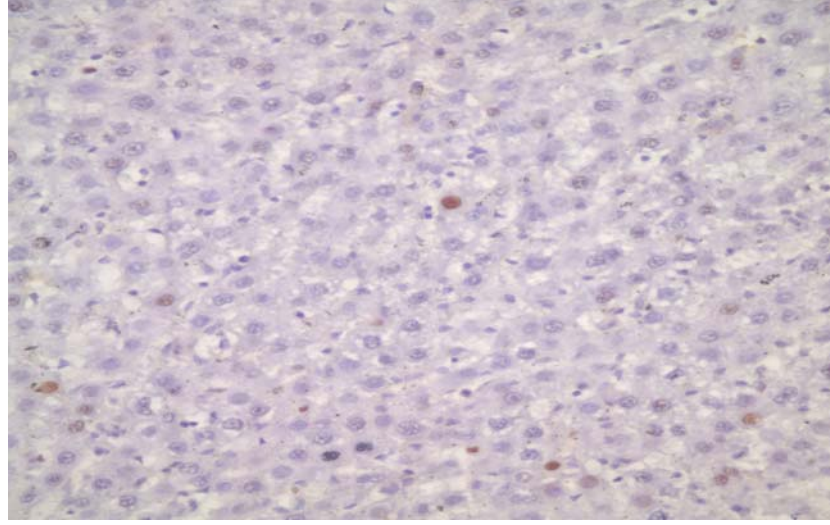
	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
Ortalama	5,0	50,0	38,8	38,8	29,4	11,9	6,3	11,3
Ortanca	5,0	50,0	30,0	40,0	30,0	10,0	5,0	7,5
%25	5,0	35,0	25,0	35,0	20,0	5,0	5,0	5,0
% 75	5,0	65,0	50,0	45,0	35,0	15,0	7,5	15,0
<i>p</i>- değerleri		0,001	0,001	0,001	0,001	0,010	0,143	0,027



Şekil 4.1 Yüzde 70 hepatektomi sonrası PCNA aktivite indeksinin günlere göre dağılımı.



Şekil 4.2 : PCNA ile %90'dan fazla boyanmış hepatosit çekirdekleri.



Şekil 4.3: PCNA ile %5'den az boyanmış hepatosit çekirdekleri.

4.2 Anjiogenez Değerleri

4.2.1 Periportal Hepatositlerdeki Anjiogenez Değerleri

VEGF immünreaktivitesi periportal ve perisinüzoidal alanlarda değerlendirilmiştir. Periportal alandaki hepatositlerdeki VEGF immünreaktivitesindeki artış 1. gün değerleri ile karşılaştırılarak anlamlılık hesaplanmıştır. P değerinin 0.05'den düşük olduğu ilk gün ilk anlamlı artış, 0.1'den büyük olduğu ilk gün ise ilk anlamlı düşüş olarak kabul edilmiştir. Periportal alandaki anjiogenez ilk olarak 3. günde anlamlı olarak artmış (p:0.01), 5. günde ise anlamlı azalma göstermiştir (p:0.328). En yüksek değerine ise 3. günde ulaşmıştır. Periportal hepatositlerin günlere göre VEGF immünreaktivite değerleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Periportal alandaki VEGF immünreaktivitesinin günlere göre değerleri.

SIRA	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
1	0	1	0	1	0	2	0	0
2	1	1	0	3	0	1	1	0
3	1	0	0	2	1	0	1	0
4	1	1	0	1	1	0	1	0
5	2	0	0	3	1	0	1	0
6	1	0	0	2	2	2	2	0
7	2	0	0	2	1	2	0	0
8	1	0	2	0	0	2	0	0

Rejenerasyon sürecinde periportal hepatositlerdeki anjiogenezin 1. günle karşılaştırıldığında 3. gün zirve değerine ulaştığı ve 5. gün bazal değerinde döndüğü sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.4 ve 4.5).

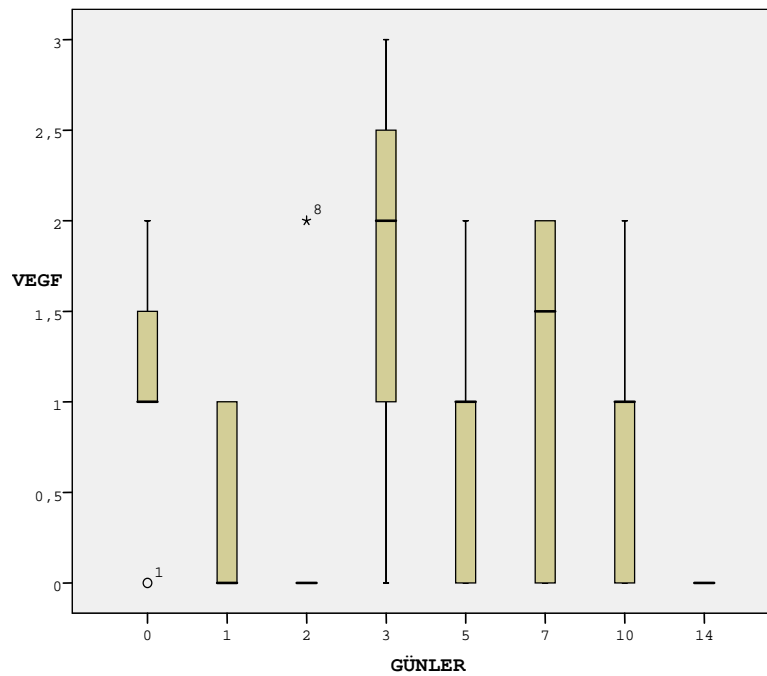
Sıfırinci gün değerlerinin yüksek olması bu günde deney materyali olarak diğer günlere ait sıçanlara hepatektomi yapıldığında elde edilen %70 hepatektomi materyallerinin kullanılması ve bu materyallerde meydana gelen cerrahi travmanın VEGF immünreaktivitesine yol açtığı düşünülmüştür. Bu nedenle değerlerdeki değişikliklerin karşılaştırılması 1. gün baz alınarak yapılmıştır. Fakat sıfırinci gün değerleriyle karşılaştırma yapıldığında ise 1. ve 2. gündeki düşüş anlamlı 3. gündeki yükselme ise anlamsız bulunmuştur.

Tablo 4.4 Periportal VEGF immünreaktivitesinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.

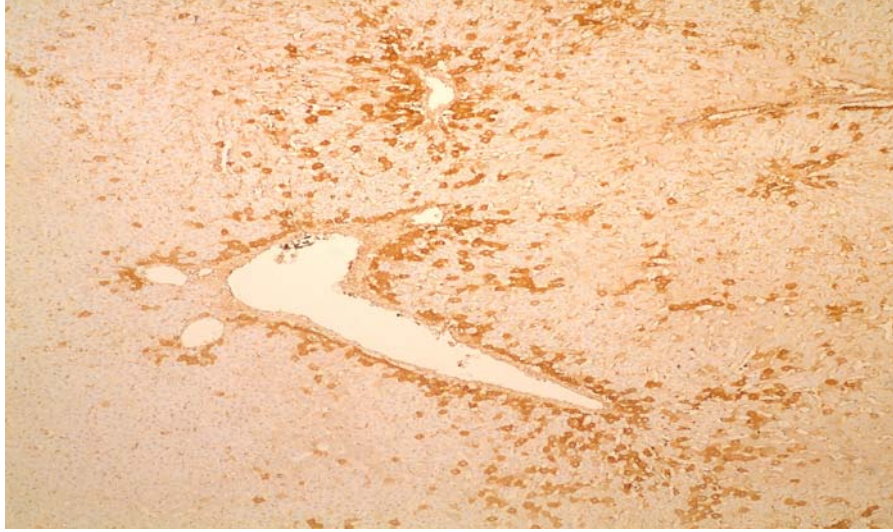
	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
Ortalama	1,1	0,4	0,3	1,8	0,8	1,1	0,8	0,0
Ortanca	1,0	0,0	0,0	2,0	1,0	1,5	1,0	0,0
%25	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0
% 75	1,5	1,0	0,0	2,5	1,0	2,0	1,0	0,0
P değerleri *				0,01	0,328			
P değerleri**		0,027	0,013	0,162	0,265	0,910	0,265	0,001

*1.gün ile karşılaştırıldığında

*0.gün ile karşılaştırıldığında



Şekil 4.4 Yüzde70 hepatektomi sonrası periportal hepatositlerdeki VEGF değerlerinin günlere göre dağılımı.



Şekil 4.5: Periportal hepatositlerin VEGF ile zayıf boyanması.

4.2.2. Perisinüzoidal Hepatositlerdeki Anjiogenez Değerleri

Perisinüzoidal hepatositlerdeki VEGF immünreaktivitesindeki artış 0. gün değerleri ile karşılaştırılarak anlamlılık hesaplanmıştır. P değerinin 0.05 den düşük olduğu ilk gün ilk anlamlı artış, 0.1'den büyük olduğu ilk gün ise ilk anlamlı düşüş olarak kabul edilmiştir. Perisinüzodal alandaki anjiogenez ilk olarak 7. günde anlamlı olarak artmış (p: 0,039), 10. günde ise anlamlı azalma göstermiştir (p: 0,196). En yüksek değerine ise 7. günde ulaşmıştır.

Tablo 4.5 Perisinüzoidal alandaki VEGF immünreaktivitesinin günlere göre değerleri.

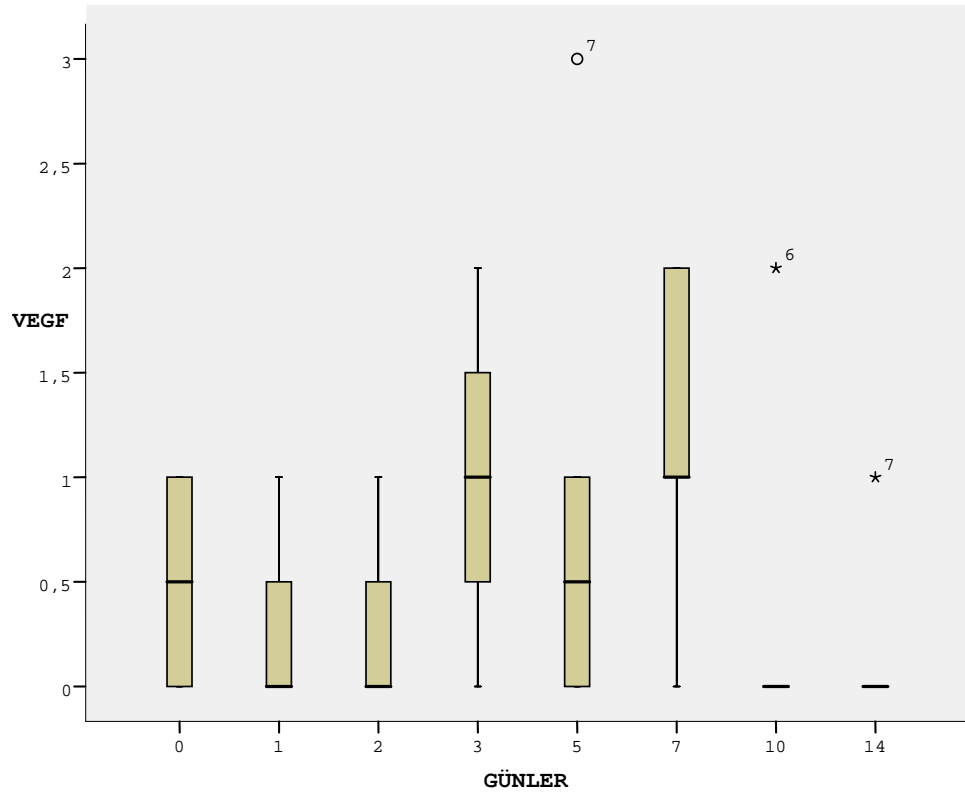
SIRA	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
1	0	0	0	1	0	1	0	0
2	0	1	0	2	0	2	0	0
3	1	1	0	1	0	1	0	0
4	1	0	0	0	1	1	0	0
5	0	0	0	1	1	0	0	0
6	0	0	1	2	1	1	2	0
7	1	0	0	1	3	2	0	1
8	1	0	1	0	0	2	0	0

Perisinüzoidal alandaki anjiogenez değeri 3. günde yükselmeye başlamış 7. günde zirve değerine ulaşmış ve 10. günde bazal değerine dönmüştür. Üçüncü ve 5. gündeki yükselme anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.6).

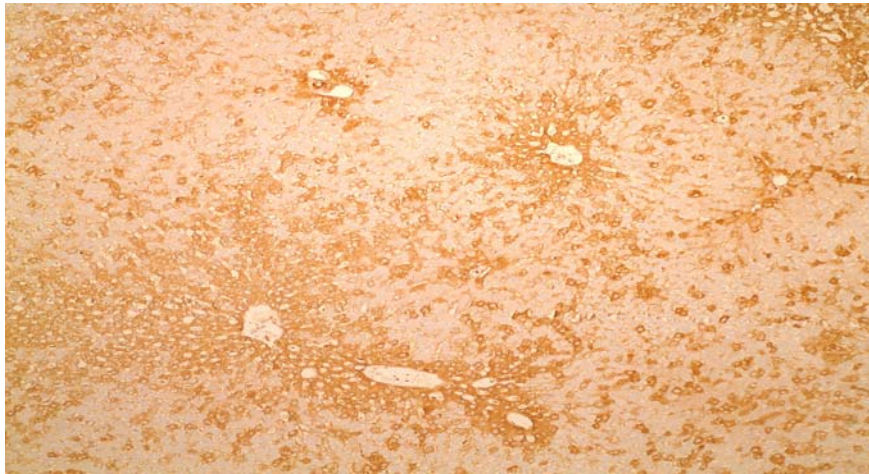
Perisinüzoidal hepatositlerin VEGF değerlerinin ortalama, ortanca, %25-%75 oran değer aralığı ve p değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6 Perisinüzoidal alandaki VEGF immünreaktivite değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.

	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
Ortalama	0,5	0,3	0,3	1,0	0,8	1,3	0,3	0,1
Ortanca	0,5	0,0	0,0	1,0	0,5	1,0	0,0	0,0
%25	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	1,0	0,0	0,0
% 75	1,0	0,5	0,5	1,5	1,0	2,0	0,0	0,0
P değerleri		0,317	0,317	0,164	0,813	0,039	0,196	0,117



Şekil 4.6 Yüzde 70 hepatektomi sonrası perisinüzoidal hepatositlerdeki anjiogenez değerlerinin günlere göre dağılımı.



Şekil 4.7: Perisinüzoidal ve perisantral VEGF ile kuvvetli boyanmış hepatositler.

4.3 Antianjiojenik Aktivite Değerleri

Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle elde edilen C18 sonuçlarının kuantifiye edilmiş sonuçlarının günlere göre dağılımı Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Kolajen18 değerinin *housekeeping* gen olarak kullanılan GAPDH veya β -Actin’e oranları antianjiojenik aktivite olarak ifade edilmiştir.

Tablo4.7 Antianjiojenik aktivite değerlerinin günlere göre dağılımı

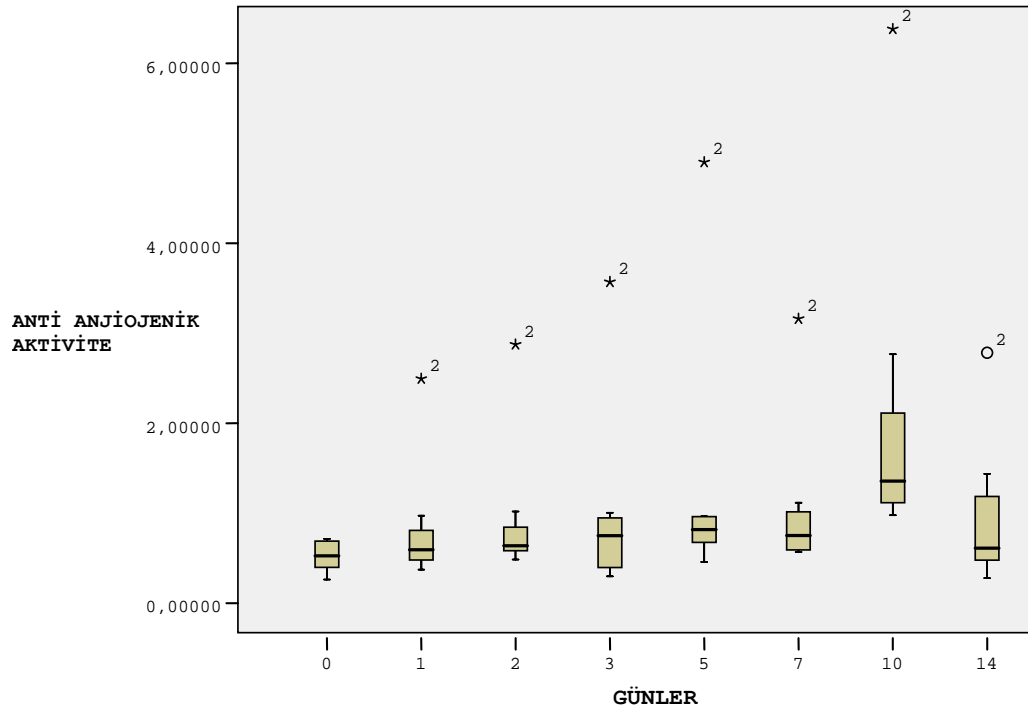
SIRA	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
1	0,49	0,43	0,58	0,39	0,62	0,69	2,76	0,59
2	0,67	2,49	2,87	3,56	4,89	3,15	6,37	2,78
3	0,26	0,37	1,01	0,29	0,78	0,80	1,38	0,62
4	0,55	0,59	0,67	0,88	0,96	1,11	0,97	1,43
5	0,71	0,97	0,64	1,00	0,84	0,91	1,33	0,93
6	0,44	0,64	0,48	0,39	0,45	0,61	1,21	0,27
7	0,35	0,52	0,57	0,69	0,72	0,56	1,01	0,40
8	0,70	0,58	0,63	0,80	0,95	0,57	1,45	0,55

Grupların antianjiojenik aktivite değerlerindeki değişikliklerin anlamlı olup olmadığı 0. gün değerleriyle karşılaştırılmıştır. P değerinin 0.05’den küçük olduğu ilk gün ilk anlamlı yükselme, 0.1’den büyük olduğu ilk gün ise ilk anlamlı düşüş olarak kabul edilmiştir. Antianjiojenik aktivitedeki ilk anlamlı artış 5. günde gerçekleşmiştir (p: 0,011). En yüksek değere ise 10. günde ulaşılmıştır (p: 0,001).

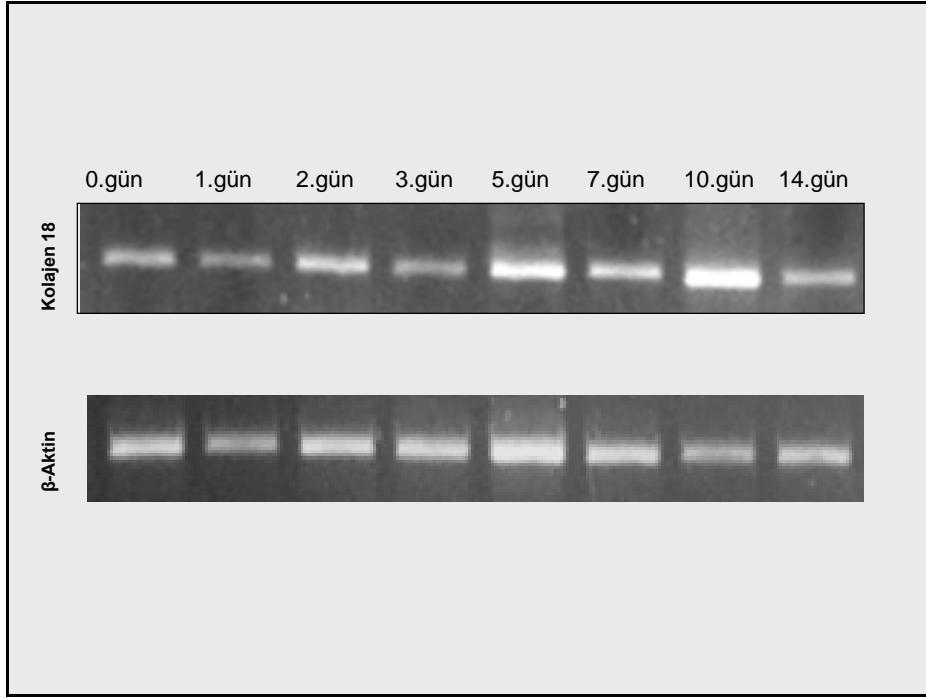
14.gündeki düşüş ise anlamlı bulunmuştur (p: 0,344). Antianjiojenik aktivite değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca, %25-%75 değer aralığı ve p değerleri Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8 Antianjiojenik aktivite değerlerinin günlere göre ortalama, ortanca değerleri ve %25-75 değer aralığı ve p değerleri.

	GÜNLER							
	0	1	2	3	5	7	10	14
Ortalama	0,525	0,829	0,935	1,006	1,283	1,055	2,066	0,950
Ortanca	0,526	0,594	0,636	0,749	0,818	0,751	1,357	0,610
%25	0,398	0,479	0,581	0,396	0,675	0,593	1,117	0,476
% 75	0,689	0,808	0,845	0,946	0,962	1,014	2,111	1,185
P değerleri		0,462	0,207	0,248	0,011	0,027	0,001	0,344



Şekil 4.8: Yüzde 70 hepatektomi sonrası antianjiojenik aktivite değerlerinin günlere göre dağılımı



Şekil 4.9: Kollajen 18'in RT-PCR yöntemiyle elde edilen ultraviyole görüntüleri (soldan sağa 0-14.gün, üst sıra C18, alt sıra β -Aktin veya GAPDH)

5.TARTIŞMA

Parsiyel hepatektomi sonrası sıçanlarda, post-operatif 7-10. günde karaciğer, optimal fonksiyona ve kitleye ulaşır. Kalan karaciğerde rejenerasyon önce hepatositlerden başlar ve 24-48 saat içinde maksimum düzeye ulaşır (1, 70). Hepatosit rejenerasyonu 72. saatte oldukça yavaşlamıştır ve hepatositler 10-12'şerlik kümeler halinde avasküler durumda bulunurlar. Bu parankimal hepatositler, parankim dışı endotelyal hücrelerle sıkı bir ilişki halindedirler. Bu ilişki özellikle karaciğer rejenerasyonu sırasında önem kazanır (2).

Bizim çalışmamızda PCNA immünreaktivitesi olarak belirlenen karaciğer rejenerasyonu normal sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası 1.günde enüst değerine ulaşmaktadır. Yine bu çalışmada 2. ve 7. günler arasındaki rejenerasyondaki artış da anlamlı bulunmuştur. Rejenerasyon 10. gününde bazal değerine inmiştir. Ondördüncü günde ise 0. güne kıyasla anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1: Yüzde 70 hepatektomi sonrası rejenerasyonunu tamamlamış karaciğerin görünümü.

Bizim çalışmamızda sıçan karaciğerinde anjiogenezi sağlayan VEGF periportal hepatositlerde 3. günde eksprese edilmeye başlandığı ve 5.günde bazal değerine indiği gösterilmiştir. Bu olay rejenerasyonun başlangıcından 48 saat sonra olmaktadır.

Perisinüzoidal hepatositlerde ise VEGF ekspresyonu 3. günde ortaya çıkmakta 5.günde zirve değerine ulaşmakta ve 10. günde ise sona ermektedir. Yani periportal hepatositler çevresindeki anjiogenezin azalmaya başladığı anda perisinüzoidal anjiogenez ortaya çıkmakta ve rejenerasyonun sona erdiği 10. günde bu da sona ermektedir. Bu bulgularla karaciğer rejenerasyonu sürecine eşlik eden anjiogenez sürecinin rejenerasyonun ilk günlerinde periportal bölgede olduğu daha geç dönemlerinde ise perisinüzoidal bölgede olduğu ve rejenerasyonun başlangıcından sonraki 48. saatten itibaren anjiogenezin olduğunu fakat farklı günlerde anjiogenezin farklı bölgelerde ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

Taniguchi ve ark. VEGF ekspresyonunun hem periportal hem de perivenüler alanda 48-72. saatte maksimum düzeylerine ulaştığını göstermişlerdir (14). Ayrıca endojen ve eksojen VEGF aracılığıyla hepatik sinüzoidlerin yeniden yapılandığını, bunun da parsiyel hepatektomi sonrası hepatosit çoğalmasına eşlik ettiği düşünülmüştür (14, 15).

Shimizu ve ark. ise VEGF mRNA ekspresyonunun 48-72. saatte anlamlı olarak arttığını, immünohistokimyasal olarak da 24. saatte hepatositlerin boyanmaya başladığını ve 72. saatte pik yaptığını göstermişlerdir (15). Benzer sonuçlara Sato ve arkadaşları da ulaşmıştır (23).

Biz bu çalışmada VEGF eksprese eden hepatositlerin periportal ve perisinüzoidal alanda 72. saatte ortaya çıktığını fakat periportal alanda anjiogenezin daha erken sona erdiğini gösterdik. İlk 48 saatte VEGF ekspresyonunun olmaması, parsiyel hepatektomi sonrası ilk 48 saatte hepatosit proliferasyonunun anjiogeneze bağımlı olmadan gerçekleştiği, sonrasında anjiogenez bağımlı hale geldiği ve bunun

da başlangıçta periportal hepatositler sonrasında perisinüzoidal hepatositler tarafından VEGF'in salınmasıyla sağlandığı düşünülebilir. Ayrıca anjiogenezin portosantral yol izlediği de söylenebilir.

Hepatosit proliferasyonu ile endotel hücre proliferasyonunun başlaması arasında yaklaşık 24-48 saatlik zaman dilimi olduğu diğer %70 hepatektomi ile yapılan rejenerasyon modellerinde de gösterilmiştir (15, 23).

Primer tümörlerin kendi büyümelerini ve metastazlarının büyümelerini anjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki dengeyi sağlayarak düzenlediği öne sürülmüştür (7). Primer tümör büyümesi üzerine anjiogenik faktörlerin etkisi belirginken metastazlar üzerine anjiogenik faktörlerin etkisi sınırlıdır. Bunun nedeni olarak tümör hücreleri tarafından salgılanan anjiogenik faktörlerin tümör çevresinde oldukça yüksek konsantrasyonda bulunması, fakat yarı ömürlerinin çok kısa olmasından dolayı uzak metastatik odaklarda konsantrasyonlarının çok düşük olması düşünülmüştür (7). Fakat antianjiogenik faktörlerin daha uzun yarı ömüre sahip olmalarından dolayı metastatik odakların anjiogenezini engellediği (*tumor dormancy*) ve primer tümörün çıkartılması halinde bu metastatik odaklar üzerindeki antianjiogenik aktivitenin azalmasına bağlı olarak metastazların büyüebildiği öne sürülmüştür. Sonuç olarak tümör gelişimini düzenleyen primer olayın anjiogenez olduğu iddia edilmektedir (7).

Doku ve serumda endostatin benzeri ebatları olan endostatin (22kDa) ile NC1 monomeri (38kDa) arasında değişen farklı proteinlerin olduğu ortaya çıkmıştır. İnsan ve fare NC1'inin menteşe kısmında 11 farklı proteolitiklere hassas nokta bulunmuştur. Bu da endostatin üretiminde farklı proteolitik yolların olduğunu düşündürmüştür (53). İmmünohistokimyasal çalışmalarda dokulardaki moleküllerin NC1'e, aort ve mikrovasküler endotel hücrelerindeki moleküllerin ise endostatine daha çok benzer olduğu görülmüştür (4, 46). Anjiogenezin homeostatik kontrolü için dolaşımdaki formunun gerekli olduğu düşünülmüştür. NC1'in birçok dokuda C18'den proteolitik yolla üretildiği, ikinci proteolitik bir yolla da endostatinin

oluştugu ve bunun parakrin ve endokrin olarak etki gösterebilecegi sonucuna varılmıştır (53).

Standker ve ark. kronik böbrek yetmezliği olan hastaların ultrafiltratlarında herhangi bir tümör odağı olmadan da endostatinin dolaşımında bulunduğunu göstermişlerdir (55). Bu bulgularla da bazal membran alanlarında bulunan C18'den salınan endostatinin, neovaskülarizasyon alanlarında parakrin etki göstermesinin yanında endokrin yolla da etki gösterebileceği düşünölmüştür (52, 53, 55).

Yara iyileşmesi ve embryo gelişimi gibi birçok fizyolojik olayı anjiogenezin düzenlediği bilinse de karaciğer gibi rejenere olma kapasitesine sahip organların rejenerasyon sürecinde optimum kitlesini hangi faktörün kontrol ettiği tam olarak bilinmemektedir (1, 3).

Bu konuda üzerinde durulan moleküllerden birisi TGF- β 1 dir. Yüzde 70 hepatektomi sonrası TGF- β 1'in HGF ile eş zamanlı yükseldiği bilinmektedir (1). İki ve 3. günler arası pik yaptığı gösterilmiştir (1). Parsiyel hepatektomi sonrası 12-48. saatler arası izole edilen hepatositlerin TGF- β 1'e dirençli olduğu, 96. saatten itibaren ise tekrar duyarlı olmaya başladığı gösterilmiştir. Yani hepatositlerin proliferere oldukları dönemde TGF- β 1'e duyarlı olmamaları, ideal kitleye ulaşan karaciğerde rejenerasyonu durduran molekülün TGF- β 1 olduğu iddasından uzaklaşılmasına neden olmuştur (1).

Greene ve ark. yaptığı çalışmada karaciğer rejenerasyonunun anjiogenez bağımlı olay olduğu gösterilmiştir (3). Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak, rejenerasyon sürecinde bu olayı sonlandıran hücrenin endotel hücresi olduğu öne sürölmüştür. Çünkü karaciğerin ideal kitleye ulaştığı günde endotel hücre proliferasyonunun sonlandığı ve endotel hücre apoptozisinin artış gösterdiği belirtilmiştir (3).

Karaciğer rejenerasyon modellerinde anjiogenezi önleyecek ajanlar verildiğinde (TNP-470), karaciğer rejenerasyonunu %46 ile % 74 oranında azalttığı

gösterilmiştir (3). Anjiyojenik faktörler verildiğinde ise (FGF) rejenerasyonun %16 ile % 42 oranında arttığı gözlenmiştir (3). Bu bulgular karaciğer rejenerasyonunun anjiogenez bağımlı bir olay olduğunu desteklemektedir (3). Anjiyojenik moleküller rejenerasyonun erken dönemlerinde rejenerasyonu arttırırken (3), antianjiyojenik moleküller rejenerasyonun geç dönemlerinde etkili olmaktadır (3, 20). Fakat normal sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası antianjiyojenik yanıtın ne zaman ortaya çıktığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Biz bu çalışmamızda normal sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası antianjiyojenik yanıtın 5. günde ortaya çıktığını 7. günde anlamlı yükselme gösterdiğini, 10. günde ise en yüksek değere ulaştığını gösterdik. Antianjiyojenik yanıt 14. günde ise bazal değerine dönmektedir. Antianjiyojenik yanıtın başlaması 5. günde perisinüzoidal bölgede pik yapan VEGF ekspresyonuyla eş zamanlı olduğu, anjiyojenik yanıtın bazal değerine indiği 10. günde ise antianjiyojenik yanıtın en yüksek değere ulaştığı görüldü. Ayrıca %70 hepatektomi sonrası ideal kitle ve hacime ulaşma zamanı ile aynı günde antianjiyojenik yanıtında zirve değere ulaştığı bulunmuştur.

Antianjiyojenik moleküllerin rejenerasyonun 7-10. günlerinde rejenerasyonu engelleyici etki göstermeleri (20), bu çalışmadan elde ettiğimiz antianjiyojenik yanıtın 5-10. günler arası ortaya çıkması sonucu ile açıklanabilir.

Anabilim dalımızda daha önce yapılan bir çalışmada, %70 hepatektomi sonrasında 1.günle karşılaştırıldığında 14.gün endostatin düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (58).

Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak %70 hepatektomi sonrası rejenerasyonun tamamlayan karaciğer dokusunda bu sürecin sona ermesini sağlayan uyarının endotel hücre kaynaklı olmayıp, hepatosit kaynaklı olduğu ve hepatositler tarafından sentezlenen C18'in bu olaya anjiogenezini engelleyerek öncülük ettiği söylenebilir.

Endostatinin %70 hepatektomi sonrası 14.günde de yüksek olduğunu göstermiş olan çalışmanın aksine (58), biz bu çalışmada C18 düzeyinin 14.günde bazal değerine ulaştığını gördük. Bu da C18' in karaciğer rejenerasyonundaki antianjiyogenik aktivitesini parakrin etkiyle gösterebileceği fakat dolaşıma katılan C18'in öncüsü olduğu endostatinin ise endokrin fonksiyonu için dolaşımda bulunmaya devam edeceği öne sürülebilir. Karaciğer rejenerasyonu sürecinde karaciğerdeki C18 ve plazmadaki endostatin düzeylerini gösteren ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak normal sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası rejenerasyon 1. günde başlamakta ve 10. günde sona ermektedir. Anjiogenez ise 3. günde ortaya çıkmakta ve 10. günde sona ermektedir. Rejenerasyonun devam ettiği 1-10.günler arası anjiogenez periportal hepatositler çevresinde başlayıp perisinüzoidal alandaki hepatositler çevresinde devam etmektedir. Bu verilerden karaciğer rejenerasyonunun anjiogenez bağımlı olay olduğu sonucu çıkarılabilir. Antianjiyogenik aktivite ise 5. günde ortaya çıkmakta, 10.günde ise pik değerine ulaşmaktadır. Ondördüncü günde ise bazal değerine inmektedir. Bu verilerle rejenerasyonun ilk 48. saate anjiogenezden bağımsız olduğu, 72. saate başlayan anjiogenezin başlangıçta periportal hepatositler sonrasında perisinüzoidal hepatositler tarafından eksprese edilen VEGF aracılığıyla gerçekleştiği ve antianjiyogenik yanıtın anjiogenezin 5. günde yaptığı 2. pik değeri ile birlikte ortaya çıktığı ve rejenerasyonun ve anjiogenezin bazal değerine ulaştığı 10. günde ise pik yaptığı sonucuna varılabilir. Bu da karaciğerin ideal kitleye ulaştığı günle benzerlik göstermektedir. Antianjiyogenik yanıtın rejenerasyonun erken dönemlerinde ortaya çıkmaması, rejenerasyonun başlangıçta anjiogeneze bağımlı olmaması ile açıklanabilir.

6.SONUÇ

Yüzde 70 hepatektomi sonrası sıçan karaciğerinde antianjiyojenik aktiviteyi ve bunun rejenerasyon ve anjiogenez ile ilişkisini ortaya koymak amacıyla planlanan bu çalışmada:

- Rejenerasyon 1.günde zirve değerine ulaşmakta ($p<0.05$) ve 10. günde bazal değerine dönmektedir ($p>0.1$).
- Anjiogenez periportal alanda 3.günde ($p<0.05$), perisinüzoidal alan da ise 5. günde zirve değerine ulaşmakta ($p<0.05$) ve periportal alanda 5. gün ($p>0.1$), perisinüzoidal alanda ise 10. günde ($p>0.1$) bazal değerine dönmektedir.
- Normal sıçan karaciğerinde %70 hepatektomi sonrası antianjiyojenik aktivitenin 5. günde ortaya çıkmakta ($p<0.05$), 10. günde zirve değerine ulaşmakta ($p<0.05$) ve 14. günde ($p>0.1$) bazal değerine dönmektedir.

Rejenerasyonun devam ettiği 1-10. günler arası anjiogenez periportal hepatositler çevresinde başlayıp perisinüzoidal alandaki hepatositler çevresinde devam etmektedir. Bu verilerden karaciğer rejenerasyonunun anjiogenez bağımlı olay olduğu sonucu çıkarılabilir. Antianjiyojenik aktivite ise 5. günde ortaya çıkmakta, 10. günde ise pik değerine ulaşmaktadır. Ondördüncü günde ise bazal değerine inmektedir. Bu verilerle rejenerasyonun ilk 48 saatte anjiogenezden bağımsız olduğu, 72. saatte başlayan anjiogenezin başlangıçta periportal hepatositler sonrasında perisinüzoidal hepatositler tarafından eksprese edilen VEGF aracılığıyla gerçekleştiği ve antianjiyojenik yanıtın anjiogenezin 5. günde yaptığı 2. pik değeri ile birlikte ortaya çıktığı ve rejenerasyonun ve anjiogenezin bazal değerine ulaştığı 10. günde ise pik yaptığı sonucuna varılabilir. Bu da karaciğerin ideal kitleye ulaştığı günle benzerlik göstermektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
2. Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins SC, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;34:1135-1148.
3. Greene AK, Wiener S, Puder M, Yoshida A, Shi B, Perez-Atayde AR, Efstathiou JA, et al. Endothelial-directed hepatic regeneration after partial hepatectomy. *Ann Surg* 2003;237:530-535.
4. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:253-270.
5. Reynaert H, Chavez M, Geerts A. Vascular endothelial growth factor and liver regeneration. *J Hepatol* 2001;34:759-761.
6. Hayes AJ, Li LY, Lippman ME. Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *Bmj* 1999;318:853-856.
7. Cavallaro U, Christofori G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol* 2000;50:63-70.
8. Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver Regeneration and Tumor Stimulation- A Review of Cytokine and Angiogenic Factors. *J Gastrointest Surg* 2008.
9. Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, Purmonen S, Pihlajaniemi T. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biol* 1998;16:319-328.
10. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285.
11. Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *J Surg Res* 2004;117:306-315.

12. Ronco MT, Frances D, de Lujan Alvarez M, Quiroga A, Monti J, Parody JP, Pisani G, et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide in rat liver regeneration. *Life Sci* 2007;81:750-755.
13. Kay MA, Fausto N. Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies. *Mol Med Today* 1997;3:108-115.
14. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem* 2001;49:121-130.
15. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001;34:683-689.
16. Assy N, Gong Y, Zhang M, Pettigrew NM, Pashniak D, Minuk GY. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 1998;131:251-256.
17. Kam I, Lynch S, Svanas G, Todo S, Polimeno L, Francavilla A, Penkrot RJ, et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* 1987;7:362-366.
18. Kahn D, Hickman R, Terblanche J, von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs--the response to different resection sizes. *J Surg Res* 1988;45:176-180.
19. Zieve L, Anderson WR, Lindblad S. Course of hepatic regeneration after 80% to 90% resection of normal rat liver. Comparison with two-lobe and one-lobe hepatectomy. *J Lab Clin Med* 1985;105:331-336.
20. Drixler TA, Vogten MJ, Ritchie ED, van Vroonhoven TJ, Gebbink MF, Voest EE, Borel Rinkes IH. Liver regeneration is an angiogenesis-associated phenomenon. *Ann Surg* 2002;236:703-711; discussion 711-702.
21. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-253.

22. Lietard J, Theret N, Rehn M, Musso O, Dargere D, Pihlajaniemi T, Clement B. The promoter of the long variant of collagen XVIII, the precursor of endostatin, contains liver-specific regulatory elements. *Hepatology* 2000;32:1377-1385.
23. Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001;34:690-698.
24. Clement B, Musso O, Lietard J, Theret N. Homeostatic control of angiogenesis: A newly identified function of the liver? *Hepatology* 1999;29:621-623.
25. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:357-369.
26. Das SK, Vasudevan DM. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. *Life Sci* 2007;81:1555-1564.
27. Quinn TP, Soifer SJ, Ramer K, Williams LT, Nakamura MC. A receptor for vascular endothelial growth factor that stimulates endothelial apoptosis. *Cancer Res* 2001;61:8629-8637.
28. Davidson AJ, Zon LI. *Biomedicine*. Love, honor, and protect (your liver). *Science* 2003;299:835-837.
29. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-31282.
30. O'Reilly MS. Antiangiogenesis and vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor targeting as part of a combined-modality approach to the treatment of cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:S64-66.
31. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:587-593.

32. Homsí J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer Control* 2007;14:285-294.
33. Papastefanou VP, Bozas E, Mykoniatis MG, Grypioti A, Garyfallidis S, Bartsocas CS, Nicolopoulou-Stamati P. VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration. *Arch Toxicol* 2007;81:729-741.
34. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890-893.
35. McCarthy M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003;361:1959.
36. Marx J. Cancer. Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. *Science* 2005;308:1248-1249.
37. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999;59:3374-3378.
38. Graepler F, Verbeek B, Graeter T, Smirnow I, Kong HL, Schuppan D, Bauer M, et al. Combined endostatin/sFlt-1 antiangiogenic gene therapy is highly effective in a rat model of HCC. *Hepatology* 2005;41:879-886.
39. Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med* 2006;57:1-18.
40. Musso O, Rehn M, Theret N, Turlin B, Bioulac-Sage P, Lotrian D, Campion JP, et al. Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:45-49.
41. Yoon SS, Eto H, Lin CM, Nakamura H, Pawlik TM, Song SU, Tanabe KK. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res* 1999;59:6251-6256.
42. Crystal RG. The body as a manufacturer of endostatin. *Nat Biotechnol* 1999;17:336-337.

43. Peeters CF, de Geus LF, Westphal JR, de Waal RM, Ruiten DJ, Wobbes T, Oyen WJ, et al. Decrease in circulating anti-angiogenic factors (angiostatin and endostatin) after surgical removal of primary colorectal carcinoma coincides with increased metabolic activity of liver metastases. *Surgery* 2005;137:246-249.
44. Oh SP, Kamagata Y, Muragaki Y, Timmons S, Ooshima A, Olsen BR. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4229-4233.
45. Sim BK, MacDonald NJ, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:181-190.
46. Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J Mol Biol* 2000;301:1179-1190.
47. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 2006;312:594-607.
48. Wen W, Moses MA, Wiederschain D, Arbiser JL, Folkman J. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 1999;59:6052-6056.
49. Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *Embo J* 2000;19:1187-1194.
50. Jia JD, Bauer M, Sedlacek N, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, et al. Modulation of collagen XVIII/endostatin expression in lobular and biliary rat liver fibrogenesis. *J Hepatol* 2001;35:386-391.
51. Musso O, Theret N, Heljasvaara R, Rehn M, Turlin B, Campion JP, Pihlajaniemi T, et al. Tumor hepatocytes and basement membrane-Producing cells specifically express two different forms of the endostatin precursor, collagen XVIII, in human liver cancers. *Hepatology* 2001;33:868-876.
52. Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. *Am J Pathol* 1998;153:611-626.

53. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *Embo J* 1998;17:4249-4256.
54. Musso O, Rehn M, Saarela J, Theret N, Lietard J, Hintikka, Lotrian D, et al. Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver. *Hepatology* 1998;28:98-107.
55. Standker L, Schrader M, Kanse SM, Jurgens M, Forssmann WG, Preissner KT. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett* 1997;420:129-133.
56. Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken EO, Schuppan D. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2001;85:1540-1545.
57. Schuppan D, Cramer T, Bauer M, Strefeld T, Hahn EG, Herbst H. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. *Lancet* 1998;352:879-880.
58. Colakoglu T, Keskek M, Colakoglu S, Can B, Sayek I. Serum endostatin levels and regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy in mice: the response to different resection sizes. *J Surg Res* 2007;143:337-343.
59. te Velde EA, Reijerkerk A, Brandsma D, Vogten JM, Wu Y, Kranenburg O, Voest EE, et al. Early endostatin treatment inhibits metastatic seeding of murine colorectal cancer cells in the liver and their adhesion to endothelial cells. *Br J Cancer* 2005;92:729-735.
60. Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VM, Folkman J, Javaherian K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity. *Cancer Res* 2005;65:3656-3663.
61. Benezra R, Rafii S. Endostatin's endpoints-Deciphering the endostatin antiangiogenic pathway. *Cancer Cell* 2004;5:205-206.

62. Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:11721-11726.
63. Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *Faseb J* 2001;15:1044-1053.
64. Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2000;60:5410-5413.
65. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, Grone HJ, Debus J, Ansorge W, Folkman J, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol Cell* 2004;13:649-663.
66. Dhar DK, Ono T, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi E, Rahman MA, Kohno H, et al. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;95:2188-2195.
67. Poon RT, Ho JW, Tong CS, Lau C, Ng IO, Fan ST. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004;91:1354-1360.
68. Hu TH, Huang CC, Wu CL, Lin PR, Liu SY, Lin JW, Chuang JH, et al. Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:663-672.
69. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Patol* 1931;12:186-202
70. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162:285-294.
71. Ojanguren I, Ariza A, Llatjos M, Castella E, Mate JL, Navas-Palacios JJ. Proliferating cell nuclear antigen expression in normal, regenerative, and neoplastic

liver: a fine-needle aspiration cytology and biopsy study. *Hum Pathol* 1993;24:905-908.