

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANA BİLİM DALI**

**SIÇANLARDA %70 HEPATEKTOMİ SONRASI OLUŞAN
YEREL VE SİSTEMİK ANJİYOJENİK VE
ANTIANKİYOJENİK YANIT**

Dr. Dauren SARSENOV

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANA BİLİM DALI**

**SIÇANLARDA %70 HEPATEKTOMİ SONRASI OLUŞAN
YEREL VE SİSTEMİK ANJİYOJENİK VE
ANTIANKİYOJENİK YANIT**

Dr. Dauren SARSENOV

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mehmet Bülent TIRNAKSIZ

ANKARA

2013



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

90

07/03/2013

Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Dr. Dauren SARSENOV 'un 07.03.2013 tarihinde jürimiz önünde savunmasını yaptığı "Sıçanlarda %70 Hepatektomi Sonrası Oluşan Yerel ve Sistemik Anjiyojenik ve Antianjiyojenik Yanıt " başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Genel Cerrahi Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Ömer ARAN
HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Danışmanı

Doç .Dr.M.Bülent TIRNAKSIZ
HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr.Erhan HAMALOĞLU
HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Prof.Dr.Osman ABBASOĞLU
HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye

Doç.Dr.Ali KONAN
HÜTF Genel Cerrahi Anabilim Dalı

ONAY

Bu tez, Tıpta ve Diş Hekimliğinde Uzmanlık Eğitimi Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından görülmüş ve Hacettepe Üniversitesi Dekanlığı tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Bülent SİVRİ
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında gösterdiği destek ve yardımlarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Bülent Tırnaksız'a; deney protokolünün yazılmasında, planlamasında ve bu çalışmanın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Dr. Ahmet Bülent Doğrul'a; çalışmanın patoloji kısmında yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Dr. Kemal Kösemehmetoğlu ve Prof. Dr. Cenk Sökmensüer ile İmmünohistokimya Laboratuvarı'ndan Özlem Kalaycı ve Şenay Korkmaz'a; çalışmanın ELISA protokollerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan HÜTF Merkez Biyokimya Laboratuvarı ekibine (Prof. Dr. Figen Akbıyık, Prof. Dr. Burçin Şener, Doç. Dr. Ahmet Pınar, teknisyenler Sevgi Çetin, Mehtap Başol ve Nilüfer Arı); istatistiksel analizin yapılmasında değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Mutlu Hayran'a; her zaman varlıkları ve desteklerini hissettiğim aileme ve bu çalışmanın yazılmasına sürekli yardımcı olan kız kardeşim Kuralay Sarsenova'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Dauren Sarsenov

ÖZET

Sarsenov D. Sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası oluşan yerel ve sistemik anjiyojenik ve antianjiyojenik yanıt. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Uzmanlık Tezi, 2013.

Amaç: Anjiyojenez karaciğer rejenerasyonunun önemli bileşenlerinden olup proanjiyojenik etkenlerle antianjiyojenik etkenler arasındaki etkileşimin bir sonucudur. Bu çalışma, hepatektomi sonrası oluşan karaciğer rejenerasyonu süresince ortaya çıkan anjiyojenik ve antianjiyojenik etkinlikleri hem yerel hem de sistemik düzeyde araştırmış, aralarında korelasyon olup olmadığını incelemiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 64 adet sıçanda %70 hepatektomi sonrası 1., 3., 5., 7., 10., 14. ve 21. günde karaciğerde ve serumda sırasıyla yerel ve sistemik anjiyojenez/antianjiyojenez süreçleri araştırılmıştır. Anjiyojenez VEGFR-2'ye, anti-anjiyojenez ise endostatine karşı immünoreaktivite olarak değerlendirilmiştir. Sistemik VEGF ile endostatin düzeyleri ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir.

Sonuçlar: Hem VEGF, hem de VEGFR-2 3. günde anjiyojenezin zirve yaptığı dönemde artma eğilimini gösterip 5. günde tepe değerlerine (VEGF için 260,60 pg/ml, VEGFR-2 için 3.63) ulaşmıştır. Her iki belirtecin 21. günde bazal düzeylerine döndüğü izlenmiştir. Sistemik endostatin düzeyinin 7. günde tepe (68,83 ng/ml) yaptığı, dokudaki endostatin dışavurum düzeyinin ise 7. ile 14. günler arasında yüksek (düzeyi = 2) seyrettiği tespit edilmiştir. On dördüncü ve 21. günde doku endostatininin azalmaya başladığı, sistemik endostatininin ise plato çizdiği izlenmiştir.

Tartışma: Bahsedilen her iki sürecin sistemik belirteçleri olan VEGF ve endostatin arasında kuvvetli korelasyon bulunmuş olup her grupta her bir parametre için ortalama alınıp VEGF değerinin endostatin değeri ile bölünmesi sonucu VEGF-endostatin oran eğrisi oluşturulmuştur. Bu oranın patolojik olarak artmış anjiyojenez süreçlerinde iyi bir teşhis ve tarama testi olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Ancak bunun için ileri klinik prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: vasküler endotelyal faktör, endostatin, VEGF-endostatin oranı, anjiyojenez, anti-anjiyojenez, karaciğer rejenerasyonu.

Destekleyen Kuruluş: HÜTF Bilimsel Araştırmalar Birimi, 012 D06 101 013.

ABSTRACT

Sarsenov D. Local and systemic angiogenic and antiangiogenic response in rats after 70% hepatectomy. Hacettepe University Medical Faculty; Prepared as General Surgery Speciality Thesis, 2012.

Aim: Angiogenesis is an important component of liver regeneration and occurs as a result of interaction between the proangiogenic and anti-angiogenic activities. This study investigated these two activities at both local and systemic levels and studied the possible correlation between them during hepatic regeneration.

Material and method: In this study 64 female rats underwent 70% hepatectomy and were sacrificed on the posthepatectomy days 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21. In each group local and systemic effects of angiogenesis and anti-angiogenesis were evaluated. Angiogenesis was defined by immunoreactivity to VEGFR-2, while anti-angiogenesis was determined by immunoreactivity to endostatin. Systemic VEGF and endostatin were identified by ELISA with corresponding antibodies.

Results: Both VEGF and VEGFR-2 began to rise on day 3. On day 5 both of them reached local peak with 260,60 pg/ml for VEGF and 3.63 degrees for VEGFR-2 expression. At day 21 both parameters returned to basal level. Peak values of systemic endostatin (68,83 ng/ml) were detected on day 7. Local endostatin expression in tissue was found to be high through groups from 7th to 14th days (with mean degree of expression equalling 2). On day 14 through 21 when tissue endostatin went decreasing systemic one made some plateau.

Discussion: As one of the aims of this study, the ratio or correlation between systemic VEGF and endostatin proved to have high level correlation coefficients (with $\rho > 0.69$) among 5th, 7th, 10th, 14th and 21st day groups. Obtained VEGF-endostatin ratio is thought to be able to supply us with an instrument to measure angiogenesis and anti-angiogenesis balance which is to be defined by prospective clinical studies in the future.

Keywords: vascular endothelial growth factor, endostatin, VEGF-endostatin ratio, angiogenesis, anti-angiogenesis, liver regeneration.

Supported by: HUSM, Scientific Research Unit, 012 D06 101 013.

İÇİNDEKİLERSayfa No:

| | |
|--|-------------|
| TEŞEKKÜR | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| TABLolar DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Karaciğer Rejenerasyonu | 3 |
| 2.1.1. Olgun Hepatositlerin Çoğalması..... | 3 |
| 2.1.2. Travma Sonrası Çoğalma..... | 3 |
| 2.1.3. Hepatosit Büyüme Etkeni (HGF)..... | 5 |
| 2.1.4. Diğer Büyüme Etkenleri | 5 |
| 2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Anjiyojenez | 6 |
| 2.2.1. Anjiyojenez Düzenlenmesi | 6 |
| 2.2.1.1. Bazal Membran Yıkımı: Proteolitik Enzimler | 6 |
| 2.2.1.2. Endotel Hücre Göçü ve Çoğalması | 7 |
| 2.2.1.3. Damar Endoteli Büyüme Etkeni | 7 |
| 2.2.1.4. Damar Endoteli Büyüme Etkeninin Türleri ve Reseptörleri | 8 |
| 2.3. Tümör Anjiyojenezi..... | 9 |
| 2.3.1. Tümör Gelişiminde Anjiyojenezin Rolü..... | 9 |
| 2.3.2. Antianjiyojenik Ajanlar | 9 |
| 2.4. Endostatin | 10 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1. Tanım | 10 |
| 2.4.2. Kollajen 18 ve Endostatin..... | 11 |
| 2.4.3. Endostatinin Antianjiyojenik Etkisi ve Klinik Özellikleri..... | 13 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM..... | 16 |
| 3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü..... | 16 |
| 3.2. Anestezi | 16 |
| 3.3. Cerrahi Teknik | 17 |
| 3.4. Karaciğer Rejenerasyonunun Belirlenmesi | 19 |
| 3.5. Anjiogenezin Belirlenmesi | 21 |
| 3.6. Antianjiogenezin Belirlenmesi | 23 |
| 3.7. Sistemik Anjiogenezin Belirlenmesi | 25 |
| 3.8. Sistemik Antianjiogenezin Belirlenmesi | 26 |
| 3.9. Deney Sonuçlarının Sunulması..... | 27 |
| 4. BULGULAR | 29 |
| 4.1. Rejenerasyon Değerleri | 29 |
| 4.2. Anjiogenezin Değerleri..... | 31 |
| 4.3. Antianjiogenezin Aktivitesi Değerleri | 36 |
| 4.4. Anjiogenezin Sistemik Korelasyonu | 40 |
| 4.5. Antianjiogenezin Sistemik Korelasyonu | 41 |
| 4.6. VEGF-Endostatin Korelasyonu | 43 |
| 4.7. VEGF-Endostatin Oranı | 45 |
| 5. TARTIŞMA | 47 |
| 6. SONUÇ..... | 53 |
| 7. KAYNAKLAR | 55 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------------|--|
| VEGF | – Damar Endoteli Büyüme Etkeni (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |
| VEGFR-2 | – Damar Endoteli Büyüme Etkeni Reseptörü-2 (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>) |
| COL18 | – Kollajen 18 (<i>Collagen 18</i>) |
| PCNA | – Çoğalan Hücre Çekirdeği Antijeni (<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>) |
| uPA | – Ürokinaz Plasminojen Etkinleştiricisi (<i>Urokinase type Plasminogen Activator</i>) |
| HGF | – Hepatosit Büyüme Etkeni (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>) |
| TGF- α/β | – Dönüştürücü Büyüme Etkeni α/β (<i>Transforming Growth Factor α/β</i>) |
| ρ | – İlgileşim katsayısı (<i>rho</i>) |
| TNF- α | – Tümör Nekroz Etkeni-alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>) |
| IL-1-11 | – İnterlökin 1-11 (<i>Interleukin 1-11</i>) |
| EGF | – Epidermis Büyüme Etkeni (<i>Epidermal Growth Factor</i>) |
| IQR | – Çeyrekler Arası Oran (<i>Interquartile Ratio</i>) |
| DNA | – Deoksiribonükleik asit |
| PHF/NF κ B | – Posthepatectomy Factor/Nuclear Factor Kappa B |
| STAT-3 | – Signal Transducer and Activator of Transcription-3 |
| FGF | – Fibroblast Büyüme Etkeni (<i>Fibroblast Growth Factor</i>) |
| ECM | – Hücre Dışı Matriks (<i>Extracellular Matrix</i>) |
| MMP | – Matriks metaloproteinaz (<i>Matrix Metalloproteinase</i>) |
| PGF | – Plasenta Büyüme Etkeni (<i>Placental Growth Factor</i>) |

HCC – Hepatosellüler karsinom (*Hepatocellular Carcinoma*)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

| | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 3.1. | Yüzde 70 hepatektomi için çıkarılacak median (iki sarı yıldız) ve sol anterior karaciğer lobu | 17 |
| Şekil 3.2. | Hepatektomi için anestezi verilmiş denekler | 18 |
| Şekil 3.3. | On dördüncü günde sakrifikasyon ardından çıkarılan tam rejenerasyona uğramış karaciğer | 18 |
| Şekil 4.1. | Yüzde 70 hepatektomi sonrası PCNA etkinlik endeksinin günlere göre dağılımı | 30 |
| Şekil 4.2. | PCNA'nın %1'den az dışavurumu (mavi okla işaretli) | 30 |
| Şekil 4.3. | PCNA'nın %90'dan çok dışavurumu | 31 |
| Şekil 4.4. | Deneklerin deney gruplarına göre kandaki VEGF düzeyleri | 33 |
| Şekil 4.5. | VEGFR-2 doku dışavurumu | 35 |
| Şekil 4.6. | Perisantral VEGFR-2 kuvvetli boyanması | 35 |
| Şekil 4.7. | Deneklerin sakrifikasyon gruplarına göre endostatin düzeylerinin dağılımı | 37 |
| Şekil 4.8. | Hücre dışı matrikste endostatin dışavurumu | 39 |
| Şekil 4.9. | Perisinüzoidal alanlarda endostatinin kuvvetli boyanması | 39 |
| Şekil 4.10. | VEGF ile VEGFR-2 arasındaki ilgileşim | 40 |
| Şekil 4.11. | Gruplara göre VEGF – VEGFR-2 dağılımının genel eğilimi | 41 |
| Şekil 4.12. | Serum ve doku endostatininin gruplara göre dağılımı | 42 |
| Şekil 4.13. | Kan ve doku endostatinini arasındaki ilgileşim | 43 |
| Şekil 4.14. | Kandaki VEGF ile endostatin ilgileşimi | 44 |
| Şekil 4.15. | VEGF R-2 (üst sıra) ve endostatin (alt sıra) doku dışavurumu | 45 |
| Şekil 4.16. | VEGF ile endostatin ortalama ve ortanca değerlerini kullanarak oluşturulan VGEF/endostatin oran eğrileri | 46 |

TABLolar DİZİNİSayfa No:

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tablo 4.1. | PCNA dışavurumu düzeyi | 29 |
| Tablo 4.2. | Deneklerin sakrifikasyon öncesi alınan kan örneklerindeki VGEF düzeyi ve gruplara göre dağılımı | 32 |
| Tablo 4.3. | Yüzde 70 hepatektomi sonrası deneklerin doku VGEFR-2 dışavurumu | 34 |
| Tablo 4.4. | Endostatinin serumdaki düzeyi ve gruplara göre dağılımı | 36 |
| Tablo 4.5. | Endostatin doku dışavurumu ve gruplar arasındaki istatistiki fark | 38 |
| Tablo 4.6. | VGEF ile VGEFR-2 arasındaki istatistiki ilgileşim | 41 |
| Tablo 4.7. | Kan ve doku endostatin düzeyleri arasındaki istatistiki ilgileşim | 43 |
| Tablo 4.8. | Kan VGEF ve endostatin düzeyleri arasındaki istatistiki ilgileşim | 45 |
| Tablo 4.9. | Gruplar için hesaplanan VGEF/endostatin oranları | 46 |

1. GİRİŞ ve AMAC

Anjiyojenez pek çok fizyolojik sürecin önemli unsurlarından biridir. Yara iyileşmesi, kırıklar, karaciğer rejenerasyonu gibi doku onarımının gerektiği süreçlerde anjiyojenez çok önemli bir rol oynar [1-4]. Patolojik anjiyojenez (neoanjiyojenez) ise çoğu kez iskemik, enflamatuar ve neoplastik süreçlerde görülür [5-14].

Bugüne dek, pro- ve anti-anjiyojenik birçok etken ortaya çıkarılmıştır. Bu etkenler içinde en çok çalışılanları bir proanjiyojenik etken olan Damar Endoteli Büyüme Etkeni (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (*VEGF*) [3, 4, 15-18] ile antianjiyojenik işlev gören Endostatin'dir [19-25].

Anjiyojenez proanjiyojenik etkenlerle antianjiyojenik etkenler ve tüm bu etkenlerle hücre dışı matriks arasındaki etkileşim sonucu oluşur [26]. Hem fizyolojik hem de patolojik anjiyojenezde proanjiyojenik etkenler baskın gelir. Anjiyojenezin olduğu dokularda hücre dışı matriksin bileşenleri proteoliz ve yeniden senteze uğrayarak endotel hücrelerinin bölgeye göç etmesi için uygun bir ortam oluştururlar. Dolayısıyla, anjiyojenez endotel ve hücre dışı matriksin yer aldığı çok aşamalı bir süreçtir [3, 7, 9, 27, 28].

Anjiyojenez sürecinin başlaması birkaç etkene bağlıdır. Bu etkenler metabolik stres, mekanik stres, immün/enflamatuar yanıt, hormon değişiklikleri ve VEGF'dir [1, 3]. Anjiyojenez süreci değişik organlarda benzer şekilde oluşur [2].

Fizyolojik anjiyojenez ile ilgili bilgilerin büyük çoğunluğu karaciğer rejenerasyonu üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir [27, 29-37]. Bu çalışmalarda karaciğer rejenerasyonu genellikle akut zedelenme ya da kısmi hepatektomiye ikincil olarak oluşturulmuştur. Karaciğer rejenerasyonu sırasında fizyolojik bir anjiyojenez ortaya çıkar; bu süreç işlev gören karaciğer sinüzoidlerinin oluşumuna dayanır. Kısmi hepatektomi yapılan hayvanlarda VEGF hepatositlerin çoğalmasını ve karaciğer sinüzoidlerinin endotel hücreleri tarafından rekonstrüksiyonunu iletir [27, 30, 32, 34, 35].

Karaciğer rejenerasyonu çok aşamalı bir süreçtir. Rejenerasyonun ilk aşaması ürokinaz plazminojen etkinleştiricisinin (uPA) tetikleyici etkisi ile neredeyse dakikalar içinde ortaya çıkar. Buna bağlı olarak hepatositlerce salgılanan HGF

sayesinde hepatositler çoğalma fazına geçmektedir [27, 32, 34, 35]. Karaciğer rejenerasyonunda HGF asal bir mitojen olup daha birçok tanımlanmış ikincil mitojen ve proproliferatif etken de görev alır (TGF, TNF-alfa, IL-6, EGF, ko-mitojen olarak insülin vb.). Proliferatif yanıtın büyük oranda karaciğer-vücut oranına bağlı olduğu düşünülmektedir. Çoğalmanın vücudun metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilecek hepatosit kitlesi oluşana kadar sürdüğü konusunda bilgiler mevcuttur [27, 29, 31-33, 35, 37, 38].

Sürekli artan hepatosit kitlesinin bir kısmı hipoksik şartlarda kaldığı için hepatositlerin VEGF salgılaması uyarılmakta ve böylece anjiyojenez başlatılmaktadır. Hepatositler tarafından hücre dışı matrikse kollajen-18 dışavurumu yapılır. Kollajen-18'in hücre dışı proteinaz-bağlı modifikasyonu sonucu güçlü antianjiyojenik etken olan endostatin ortaya çıkmaktadır. Endostatinin endotel hücrelerinin çoğalmasını ketlediği ve sonuç olarak da anjiyojenezi sonlandırdığı gösterilmiştir [3, 27, 29, 31, 32, 35, 37, 39-41].

Çeşitli klinik çalışmalarda, farklı patolojik durumlarda (romatoid artrit, sistemik sklerozis, metastatik tümörler gibi) sistemik VEGF/endostatin oranı, klinik seyir için kestirici bir değer olarak kullanıma sunulmuştur. Ancak, bütün bu bahsedilen çalışmalarda patolojik süreç sırasındaki anjiyojenezin sadece sistemik değerlendirilmesi yapılmış olup yerel histopatolojik süreçlere dayanarak deneysel kalibrasyon ve normalleştirme yapılmamıştır [42-46].

Bu çalışmanın amacı sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası oluşan rejenerasyon sürecinde endojen anti-anjiyojenik etkinliğin yerel ve sistemik olarak araştırılması ve bu etkinliğin rejenerasyon sürecindeki seyrinin belirlenmesi ve anjiyojenez ile rejenerasyon arasındaki ilişkinin ortaya konması idi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Rejenerasyonu

Genel olarak memeli hayvanların dokuları her türlü fiziki travmaya karşı fibrotik doku gelişimi ile kendilerini iyileştirirler [27, 29, 32, 33, 47]. İnsan dahil bütün memelilerde fibrotik ve işlevsel olmayan doku oluşturmak yerine tamamen görevini sürdürebilecek şekilde kendini yenileyerek travma öncesi hacmine ulaşabilen tek organ karaciğerdir. Karaciğer “rejenerasyonu” yaygın olarak kullanılan bir terim olsa da, bu süreç aslında bir hiperplazidir. İstirahat halinde bulunan karaciğerde mitoz oranı 1/20000 olup hücre çoğalması ile apoptozisi arasında optimum bir denge vardır [27, 32, 35, 36, 48, 49].

Kaybolan karaciğer kitlesi yerine üç ayrı düzenek ile konur: 1) olgun hepatositlerin çoğalması, 2) kök hücrelerin farklılaşması ve çoğalması ve 3) periportal hepatositlerin çoğalması. Adı geçen bu üç düzenek ihtiyaç halinde yukarıdaki sırayla ortaya çıkmaktadır [36].

2.1.1. Olgun Hepatositlerin Çoğalması

Rejenerasyon sırasında olgun hepatositlerin büyük çoğunluğu (%95) sürece katılmalarına karşın bu hücrelerin çoğalma katsayıları düşüktür [47]. Periportal hepatositlerin diğer hepatosit türlerine göre daha daha hızlı çoğaldıkları gösterilmiştir [34]. Hepatik venlerin çevresindeki hepatositlerin daha yavaş çoğalmalarının, portal ven kaynaklı hipertrofik etkenlerin bulunmamasına bağlı olduğu sanılmaktadır [29, 36, 50].

2.1.2. Travma Sonrası Çoğalma

Olgun hepatositlerin çoğalması herhangi bir nedenle oluşan işlevsel hacim kaybına ikincil olarak ortaya çıkmaktadır [29, 34, 36].

Deneyisel sıçan modellerinde karaciğerin travma öncesi işlevsel hacmine ulaşması 7 ila 10 gün almaktadır [29, 36, 47]. İnsan karaciğerinde bu süre daha uzun olup sağlıklı karaciğerde 1 ila 2 ay, hastalıklı karaciğerde ise 3 ila 4 ay sürmektedir [29]. Seri bilgisayarlı tomografi incelemeleri, karaciğerin büyüme hızının ($\text{cm}^3/\text{gün}$) rezeksiyon miktarı ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir [51].

Hücre kaybını takiben ortaya çıkan rejenerasyon sürecine karaciğer hücrelerinin bütün alt türleri katılmakla birlikte, bunu en büyük oranda hepatositler gerçekleştirir [34]. Karaciğerin %70 rezeksiyonu sonrası dakikalar içerisinde hücreler mitoz girmektedir [34, 36, 47]. S fazına 12 ila 24 saat içinde giren hücrelerde maksimum DNA sentezi 24. ila 48. saatlerde görülmektedir [17, 29, 34, 40, 47]. Tüm hücreler bir veya iki mitoz döngüsüne girdikten sonra dinlenme durumuna geçmektedirler [34].

Yapılan Ki-67 ve PCNA çalışmaları rejenerasyonun 24 ila 48 saatler arasında zirve yaptığını, sürecin 72. saate kadar da zemin düzeyin üzerinde seyrettiğini göstermektedir [52-54].

Çeşitli büyüme etkenleri dışında karaciğer rejenerasyonu sürecini ayarlayan bir başka etmen de karaciğer/beden kütlesi oranıdır [34, 47]. Yapılan rezeksiyon hacmine veya transplant boyutuna göre, karaciğer/vücut kitlesi oranı fizyolojik değere ulaşıncaya kadar rejenerasyon sürmektedir [29, 34, 38].

Yüzde 15'den küçük karaciğer rezeksiyonlarında belirgin bir rejenerasyon yanıtı görülmemektedir [55]. Rejenerasyonun gerçekleşip gerçekleşmeyeceği, gerçekleşecekse de oranı yapılan rezeksiyon miktarına göre belirlenmektedir. Yüzde 80-90 hepatektomi yapılanlarda çoğalma 24. saatte artmaya başlayıp 36-96. saatlerde maksimuma ulaşır ve 7. günde zemin düzeye döner. Yüzde 70 hepatektomi yapılanlarda ise çoğalma 12. saatte başlayıp 24-78. saatte maksimum seviyesine ulaşır ve 5. günde normal düzeyine döner [56].

Hepatosit havuzu dışındaki hücreler (biliyer epitelyositler, sinüzoid endotel hücreleri, Kupffer hücreleri ve satelit hücreleri) çoğalmaya 24 saat daha geç katılırlar [47].

Başta HGF olmak üzere EGF, TGF- α gibi birçok etken endokrin ve parakrin olarak hepatosit DNA sentezini uyarmaktadırlar. Rejenerasyonu ketleyen en önemli etkenler arasında TGF- β 1 ve aktivin yer almaktadır [17, 29, 34, 36, 47]. İnterlökin 6, IL-1 ve TNF- α ise ketleyici etkinlikleri daha düşük olan diğer etkenlerdir [17, 29, 36, 49].

Kliniğimizde yapılan bir çalışmada sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası rejenerasyon ve anjiyojenezin zemin düzeye döndüğü 10. günde, endostatin öncülü

olan kollajen18 mRNA dışavurumunun tepe yaptığı gösterilmiştir. Bu da karaciğerin ideal kitleye ulaşmasıyla birlikte rejenerasyonu durduran uyarının yine hepatositlerden salınan endojen antianjiyojenik ajanlar olduğu yorumunu doğurmuştur. Fakat bu çalışmada mRNA'dan oluşan proteinlerin üretimi araştırılmamıştır [54].

2.1.3. Hepatosit Büyüme Etkeni (HGF)

Hepatosit Büyüme Etkeni, hepatosit DNA sentezinin hem in vitro hem de in vivo güçlü uyararı olup EGF ve TGF- α ile birlikte hücre kültüründe başka etkenlere ihtiyaç olmaksızın hepatosit çoğalmasını tetikler [47]. Hepatosit Büyüme Etkeni'nin serum düzeyi rezeksiyon sonrası 1. saatte yükselip 72. saate kadar yüksek kalır [47]. HGF reseptörünün fosforilasyonu sonucu tirozin kinaz sinyal dizisi etkinleşir ve protoonkojen c-Met aracılı DNA sentezi birkaç saat içerisinde başlar. HGF'nin etkisinin maksimuma ulaşabilmesi için IL-6 ve TNF- α aracılığıyla hepatosit kıvamlama sürecinin başlatılması gerekir [29, 31]. Mezenkim hücrelerince salgılanan HGF, epitel ve endotel hücreleri için güçlü bir mitojen olduğu kadar belirgin anjiyojenik etkiye de sahiptir. İn vitro çalışmalarda HGF'nin endotel hücre çoğalmasını, göçünü ve ayrışmasını artırdığı gösterilmiştir [29].

2.1.4. Diğer Büyüme Etkenleri

Karaciğer rejenerasyonunda DNA sentezini tetikleyen diğer etkenler arasında EGF, TGF- α ile insulin yer almaktadır. TGF ile EGF mezenkim ve epitel kökenli olup etkilerini birlikte göstermektedirler. İnsülin tek başına etki gösterememekle birlikte diğer etkenler için ko-mitojen olarak işlev görür [29, 47, 49].

Tümör Nekroz Etkeni- α (TNF- α) etkinleşmiş monosit/makrofaj ailesi hücrelerinden salgılanır ve rezeksiyon sonrası 48. saatte tepe değerine ulaşır hepatosit kültüründe sitotoksik etki gösterir [29, 47, 49].

İnterlökin-6, TNF- α uyarısıyla retikuloendotel sistemi hücrelerinden salgılanıp 24. saatte tepe değerine ulaşır [47]. İnterlökin-6, IL-1 ve TNF- α iki farklı transkripsiyon etkenini etkinleştirir. Bu etkenler Posthepatectomy Factor/Nuclear Factor kappa B (PHF/NF κ B) ve Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (STAT-3) etkenleridir. Etkinleştirilmiş olan bu etkenler c-fos, c-jun, c-myc gibi

genlerin transkripsiyonuna yol açarlar. Bu genlerin kopması durumunda ortaya çıkan hepatosit çoğalmasında azalma ve artmış hücre ölümü, G1 hücre döngüsü modülatörü olan siklin E ve D1 bağımlı kinazların etkinleşmesindeki azalma veya gecikmeyle açıklanabilir [29, 36, 40, 47].

2.2. Karaciğer Rejenerasyonu ve Anjiyojenez

Anjiyojenez fizyolojik ve patolojik birçok süreçte yer almakta olup 1860'lı yıllarda tanımlanmış, 1971'de de tümör gelişiminde ve metastaz oluşumunda asal rol oynadığı fikri ortaya atılmıştır [1, 7, 9-11]. Organogenez, yara iyileşmesi, ovülasyon gibi birçok süreç, fizyolojik anjiyojenezin gerçekleştiği durumlar arasında sayılabilir. Patolojik anjiyojeneze ise endometriyozis, romatoid artrit, psoriasis, hemanjiom ve bütün tümörler örnek verilebilir [5, 7, 9, 13, 14, 57, 58]. Anjiyojenezi uyaran birçok proanjiyojenik etken tanımlanmış olup en güçlüleri VEGF ile FGF'dir [10, 11, 59]. Antianjiyojenezi sağlayan etkenlerin sayısı ise gün geçtikçe artmakta iken en güçlü temsilcileri anjiostatin, endostatin ve trombospondin-1 olarak bilinmektedir [2, 3, 21, 60].

2.2.1. Anjiyojenez Düzenlenmesi

2.2.1.1. Bazal Membran Yıkımı: Proteolitik Enzimler

Anjiyojenez, bazal membranın yıkımıyla endotel hücrelerinin proanjiyojenik etken salgılayan dokuya doğru ilerlemesi ile başlar. Bazal membran devamlılığını bozan etken, serum serin proteaz'ı tarafından etkinleştirilen plazmindir [3, 60, 61]; bunu, hücre dışı matrikste bulunan fibrin, fibronektin, laminin ve proteoglikanların yıkımını tetikleyerek gerçekleştirir.

Hücre dışı matrikse çıkan fibrin endotel hücrelerinin etkinleşmesi için zemin hazırlamaktadır; ayrıca, endotel hücresi üzerinde oldukça güçlü mitojenik etkisi de mevcuttur [62, 63]. Bundan başka matriks metaloproteinazları ve ürokinaz plazminojen etkinleştiricilerinin üretimini uyardığı da gösterilmiştir. Fibrin uyarısıyla endotel hücreleri üzerinde damar adezyon ve hücre içi adezyon moleküllerinin dışavurumu artmaktadır [36, 64]. Fibrin'in monosit kemotaksisini artırdığı ve kimyasal ajanlara ikincil gelişen karaciğer hasarını azalttığı da gösterilmiştir [64].

Fibrinin patolojik anjiyojenezden sorumlu olduğu belirlenmiştir (diabetik retinopati, romatoid artrit, vb) [24, 62, 65].

Plazminle birlikte matriks ve bazal membranın yıkım sürecinde yer alan diğer bir etken de matriks metaloproteinaz (MMP) enzimleri ailesidir; bugüne kadar yapı ve duyarlılıklarına göre sınıflandırılmış en az 16 üye tanımlanmıştır. Meme, kolon, over ve mide kanserleri gibi birçok tümörlerde MMP etkinliğinin arttığı gösterilmiştir [3, 30, 60, 66].

2.2.1.2. Endotel Hücre Göçü ve Çoğalması

Hücre dışı matriksin yıkımı sonrası endotel hücreleri derişim gradiyenti boyunca hipoksik bölgeye göç ederek hücre dışı matriksten salgılanan birçok büyüme etkeninin etkisiyle çoğalmaya başlarlar.

Anjiyojenik etkenler gösterdikleri etki ve bu etkinin dolaylı veya doğrudan olmasına bağlı olarak 3 gruba ayrılırlar: 1) Damar Endoteli Büyüme Etkeni (VEGF) ve anjiyopoetinler (etkileri endotele özgüdür), 2) sitokin ve anjiyojenik enzimler (FGF-2 gibi) ve 3) TNF- α gibi retiküloendotel sistemi ve tümör hücreleri tarafından salınan, diğer büyüme faktörlerinin salınımını etkinleştirerek ve modüle ederek etki gösteren dolaylı etkenler [17].

Bütün bu etkenlerden evrensel ve en önemli etkiye sahip olanı VEGF'dir [3, 17, 40, 50].

2.2.1.3. Damar Endoteli Büyüme Etkeni

1983 yılında tümör hücrelerinin damar yatağına etkisi üzerinde çalışılırken Damar Geçirgenlik Etkeni (VPF) adıyla tanımlanan madde ile, 1989 yılında izole tümör hücreleri çalışmalarında ortaya çıkan ve VEGF olarak adlandırılan etkenin aynı olduğu anlaşılmıştır. VEGF, makrofaj, granülosit ve endotel hücrelerinin hipoksik bölgeye göçünü sağlayan güçlü bir kemoatraktandır [8, 10, 11, 67].

Sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası VEGF dışavurumunun 24. saatte ortaya çıktığı, 48 ila 72 saat sonunda tepe değerine ulaştığı gözlenmiştir [17, 40]. Rejenerasyon sürecinde olan karaciğerde VEGF pozitif hücrelerin çoğunun periportal alanda olduğu gösterilmiştir. Sinüzoid endotel hücrelerinin ise VEGFR

(VEGF reseptörü) antikoru ile boyanması 72 ila 120. saatler arasında ortaya çıkar. Dolayısıyla, sinüzoid endotel hücrelerinin çoğalmasını artıran etken, hipoksi yaşayan periportal hepatositler tarafından salgılanan VEGF'dir [63].

2.2.1.4. Damar Endoteli Büyüme Etkeninin Türleri ve Reseptörleri

VEGF ligandının birçok türü tanımlanmıştır [62]. İnsan dokularında etkilerini gösterenler arasında Plasenta Büyüme Etkeni (PGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve VEGF-F (VEGF-F bazı yılanların zehirlerinden elde edilmiştir) bulunmaktadır. Bu ligandlara karşı farklı güçte ilgisi olan reseptörler tanımlanmıştır. Bunlar: VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (kdr-flk-1) (en geniş ilgiye ve biyolojik öneme sahip olan tür) ve VEGFR-3 (flt-4)'tür. Bütün bu reseptörler tirozin kinaz reseptör üst ailesinin üyesidirler [30, 36, 50, 62, 65, 68, 69].

Karaciğer rejenerasyonu sırasında ilk dışavurumu olan reseptör VEGFR-1'dir. VEGFR-1 dışavurumu endotel hücre çoğalmasının başlaması ile eş zamanlı, VEGFR-2 dışavurumu ise endotel hücre çoğalmasının tepe değerine ulaşması ile eş zamanlı olur ve 5 gün boyunca yüksek kalır. [70].

VEGF-A ligandı karaciğer rejenerasyonu sırasında her iki reseptöre de bağlanabilir [16, 62, 64]. VEGFR-1'in etkinleşmesi endotel hücre çoğalmasına yol açar. VEGFR-1'in endotel hücreleri etkinleşmiş olmaksızın doğrudan da hepatosit çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir [64]. VEGF-A/B normal ve patolojik anjiyogenezde görev alırken lenfanjiyogenezde ise VEGF-C/D ligandları görev alır [30, 62, 69].

Bevacizumab bir anti-VEGF antikoru olup, metastatik kolon kanserinde, meme ve akciğer kanserlerinde kemoterapiye eklendiğinde sağkalıma olumlu etkisi olduğu gösterilmiş bir ilaçtır. [24, 62, 71, 72]. Bir dolaylı etki olarak, radyoterapiye olan duyarlılığı da artırmaktadır [73]. Antianjiyogenik bir madde olan endostatin ile birlikte kullanıldığında ise HCC modellerinde daha etkili olduğu bilinmektedir. [74].

2.3. Tümör Anjiyojenezi

2.3.1. Tümör Gelişiminde Anjiyojenezin Rolü

Anjiyojenez süreci hem normal hem de tümör dokusunun gelişiminde son derece önemli bir yer tutar [62]. Yapılan çalışmalarda vücuttaki birçok organda anjiyojenik fenotipi sergilemeyen in situ karsinom odağı bulunduğu ve sadece 1/600'ünün bahsedilen fenotipi kazanarak tümör oluşturduğu gösterilmiştir. Endojen antianjiyojenik ajanların bu fenotip değişimini engellediği ve fizyolojik anjiyojenezi de sınırladığı konusunda yorumlar vardır [10, 11].

Anjiyojenez, tümörün sadece yerel gelişimi için değil metastaz yapabilmesi için de çok önemlidir [5, 11, 28, 44, 46, 59, 61, 62, 75-79]. İn situ bir tümör anjiyojenik fenotip kazandığında büyüme hızı 20 kat artmaktadır. Damarsız kalan karsinom odaklarının 2 mm³'den daha büyük hacme ulaşamayıp sabit kaldıkları görülmüştür. Tümör dokusu damarlaşma yoğunluğunun prognozla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir [80].

Anjiyojenez süreci sırasında tümörün büyümesini, istilacı özelliklerini sağlayan birçok etken endotel hücreleri tarafından üretilir. Anjiyojenezin ayrıca parakrin etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir [24, 60, 67].

Tümör anjiyojenezinin dışavurum gücünün histolojik yerleşimine bağlı olduğu gösterilmiştir. Tümörün ayrılaşma derecesi ve köken aldığı dokuya göre değişen parametreler için şöyle örnek verilebilir: böbrek karsinomunun böbrek kapsülüne ekilmesi, deri altına ekilmesine göre 18 ila 20 kat daha fazla FGF üretmektedir [81].

2.3.2. Antianjiyojenik Ajanlar

Tümör gelişiminin, anjiyojenik fenotip sergileyip sergilememesine bağlı olduğunun ortaya çıkması sonrasında anjiyojenezi hedefleyen maddeler araştırılmaya başlanmıştır [75, 80].

Anjiyojenez sürecini normal şartlarda durduran ve fizyolojik sınırları içinde tutan antianjiyojenik etkenlerin var olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Antianjiyojenik maddeler etki mekanizmalarına göre şu şekilde sıralanabilir: 1)

süregelmekte olan anjiyojenez sürecini yavaşlatan maddeler, 2) anjiyojenezi başlatan ve hızlandıran etkenleri ketleyen maddeler (anti-VEGF antikorları) [62], ve 3) endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü engelleyen etkenler (TNP-470, β -siklodekstrin, D-penisilamin, vs.) [60].

Bilinen en güçlü antianjiyojenik moleküller anjiyostatin ve endostatindir. Her ikisinin de proteolitik etkinliğe ikincil olarak plazminojen ve Kollajen 18'den üretildiği deneysel tümör modellerinde gösterilmiştir. Bu moleküllerin bahsedilen modelde tümör anjiyojenezini ketlediği gözlenmiştir. Bu özellikler dışında her birinin tümör ve onun metastazları üzerinde belli modülatör etkilerinin de olduğu düşünülmektedir [20, 21, 82].

Primer tümörün rezeksiyonu sonrası metastatik tümörlerinin daha hızlı büyümesi, endostatinin primer tümör odağı tarafından üretildiğine dair bir bilgi olarak kabul edilmiştir [83, 84]. Doğal olarak, primer tümörün anjiyojenik fenotipe sahip olduğu halde antianjiyojenik etkinlik de sergilemesi bir soru ortaya çıkarmıştır. Bilindiği gibi her türlü fizyolojik veya patolojik süreç ya da etki için negatif ve pozitif geri bildirim sistemleri tanımlanır. Gerçekten de, yapılan bir çalışma endostatin salınımının primer tümörün hücre dışı matrikste oluşan proteolitik etkinliğe ikincil olduğunu göstermiştir [24].

2.4. Endostatin

2.4.1. Tanım

Endostatin ilk olarak O'Reilly ve ark. tarafından 1997 yılında hemanjiyotelioma hücrelerinden elde edilmiştir. Bu çalışmada, farelerde primer tümörün, 16 ila 25 günlük endostatin uygulaması ile 150 kat (1 mm³'den az hacme kadar) küçüldüğü gözlenmiş, ayrıca kullanılan dozlarda ilaç direnci ve toksisitesi ortaya çıkmadığı saptanmıştır. [24, 83].

Endostatin Kollajen-18'in bir türevi olup molekül ağırlığı da ~20 kDa'dur [10, 24, 85, 86]. Endotel hücre çoğalmasını ketleyen endostatin aslında Kollajen 18'in kollajenöz olmayan alanının karboksi ucu ile aynı molekül olduğu saptanmıştır [24, 82, 83, 86, 87].

Kollajen 18'in kollajenöz olmayan kısmının alanin-histidin bağının ilkin MMP sonra da doku elastazı tarafından yıkıldığı düşünülmüştür [86, 88]. Felbor ve arkadaşları ise anjiyojenezin yayılcı bir süreç olduğunu hatırlatarak, bu sürecin negatif geri bildirim sistemine duymuş olduğu ihtiyaç sonucu Kollajen 18'in C-terminalinin proteaz duyarlı bir reseptör olduğunu öne sürüp endostatinin katepsin-L ve matriks metaloproteinazlara bağımlı olarak üretildiğini savlamışlardır. [86, 89].

2.4.2. Kollajen 18 ve Endostatin

Kollajen-18, 1994 yılında, Oh ve arkadaşları tarafından hücre dışı matriks proteinlerinin bir alt grubu olduğu düşünülerek tanımlanmıştır [85].

Kollajen-18 (α -1)'in nükleotid analiz tekniğiyle, 10 tane üçlü sarmal ve 1 adet N-terminal uç trombospondin-1 artığı içerdiği gösterilmiştir [90]. Heparan sulfat zincirlerini de içerdiği için sadece kollajen değil proteoglikan özelliklerini de taşıdığı bilinmektedir. Kollajen 18'in evrimsel olarak yüksek oranda konservatif yapıya sahip olduğu gösterilmiştir [90].

İnsanla fare arasındaki Kollajen 18 benzerliği, molekül boyutunda %79'a varan oranda saptanmış olup en fazla benzerlik son 184 aminoasitlik bölgededir. Bu bölgeden proteolitik olarak serbestleştirilen 20 kDa'luk molekülün endostatin olduğu anlaşılmıştır [85, 91].

Kollajen 18 ve kollajen 15 aralarında %60'a varan ortak aminoasit dizilimi paylaştıklarından ve diğer kollajen türlerine göre farklı yapıya sahip olduklarından multiplerin ailesi (*multiple helix domains and interruptions*) olarak ayrı bir alt gruba ayrılmışlardır. İnsan COL-18'inin kollajenöz olmayan kısmının üçlü sarmal olmayan bölgesinin 312 aminoasitten oluştuğu (farede 315 aminoasit), ve endostatine denk gelen kısımlarının ise 129 ila 312. aminoasitler arasında olduğu (farede 130. ila 315. aminoasit) belirlenmiştir [3, 85].

Kollajen 18'in kollajenöz olmayan 38 kDa'luk kısmının heparine, fibulin-1 ile fibulin-2 gibi mikrofibrillere bağlanma kapasitesinin endostatininkine benzer olduğu anlaşılmıştır [87].

Kollajenöz olmayan kısmın yapısında 180 aminoasitlik C-terminalinden oluşan endostatin bölgesi, proteazlara hassas ~70 aminoasitlik menteşe bölgesi ve

~50 aminoasitlik N-terminal bulunmaktadır. Endostatin bölgesi birkaç farklı proteoliz hedefi olan bölge taşıdığından proteoliz sonucu farklı işlevleri olan çeşitli endostatin varyasyonlarının üretimine yol açabileceği belirtilmiştir [3, 87, 92, 93].

İnsan ve farede kollajenöz olmayan kısmın menteşe bölgesinde 11 farklı proteoliz hedefi olabilen nokta bulunmuştur. Doku ve serumda, endostatin benzeri farklı moleküler ağırlıklarda (~20-38 kDa arasında) ve farklı antianjiyojenik etkinliği olan proteinlerin bulunduğu ortaya çıkmıştır [92].

İnsan vücudunda Kollajen 18'in sentezlendiği bilinen iki formu vardır. Kısa formu bütün epitel ve endotel bazal membranlarında bulunurken, dışavurumunun endotel hücreleri ve myofibroblastlar tarafından gerçekleştirildiği ortaya konmuştur. Uzun formunun ise sadece hepatositlerce sentezlendiği ve sinüzoidal boşluklarda depolandığı gösterilmiştir [94]. Kollajen 18'in kısa ve uzun formlarının dışavurumu iki ayrı promoter tarafından kontrol edilip N-terminal nonkollajenöz kısımları ise sırasıyla 303 ve 493 aminoasitten oluşmaktadır. Bu iki tip kollajen 18'in diğer nonkollajenöz ve kollajenöz kısımları ile endostatin bölgesi aynı aminoasit dizilimini paylaşmaktadır [75, 94-96].

Kollajen-18'in kısa formunun karaciğerde satellit hücreler ve myofibroblastlar tarafından üretildiğine dair bilgi insan karaciğer biyopsi çalışmasında gösterilmiştir. Uzun form Kollajen-18'in çözülebilen fraksiyonunun plazmada bulunduğu aynı çalışmada gösterilmiştir [94, 96].

Kollajen-18'in hemen her zaman perikapiller yerleşimli olması, anjiyojenez süresince proteolitik yıkım ürünleri ile anjiyojenez üzerinde modülatör etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir [97].

Kollajen-18 akciğer, böbrek ve karaciğer gibi damarlaşması yoğun olan organlarda bulunmakla birlikte %90'ı karaciğerde yerleşiktir [95-97].

Patolojik durumlarda, örneğin sirotik karaciğerde aktif fibrozis süreci varken satellit hücrelerin COL18'in üretimini 13 kat arttırmasına karşın hepatositlerin sadece 2 kat arttırdığı görülmüştür [59, 98]. Ancak bu bilgiler bir başka çalışmada ters oran göstermiştir [91].

Hepatoselüler karsinom hücrelerinde COL18 üretiminin artmasının, anjiyojenezin artmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür [91, 94].

Guenter ve arkadaşlarının çalışmasında kolorektal veya over kanserli hastalarda COL18'in her iki grupta stromal ögeler tarafından üretildiğini; ancak sadece over kanserlerinde, kanser hücrelerinin de COL18 üretimine katkıda bulunduğu ortaya çıkmıştır [99].

Tümör dokusunun sirotik ve normal karaciğer dokusuna göre daha fazla COL18 ürettiği gösterilmiştir [100]. Endostatin yapımının karaciğer rezeksiyonunun yüzdesi ile doğru orantılı bir şekilde arttığı bulunmuştur [101]. Ayrıca, normal karaciğerin hepatektomi sonrası rejenerasyon kapasitesi ile serbest endostatin düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğu görülmüştür. Sirotik karaciğerde ise bu ilinti saptanmamıştır [101].

2.4.3. Endostatinin Antianjiyojenik Etkisi ve Klinik Özellikleri

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda endostatinin 65 ayrı tür tümör üzerine etkisi gösterilmiştir. Ayrıca anjiyojenezi kontrol eden genomun %12'sini etkileyerek patolojik anjiyojenezin baskılanmasında da rol oynamaktadır [19]. Rekombinan endostatin biyoteknolojik yöntemlerle ilk olarak *E. coli*'de üretilmiştir [10, 19, 82].

Dört gönüllü hasta üzerinde, 3,5 yıl boyunca süren çalışmada, endostatinin toksisite ve direnç geliştirme potansiyelinin hiç olmadığı gösterilmiştir [3, 82]; ayrıca, yara iyileşmesi üzerine herhangi bir olumsuz etki yapmadığı da saptanmıştır. On ila 100 mg/kg/gün doz aralığında kullanıldığında tümörlerin %47-91'inde yanıt elde edilmiştir. Doz-yanıt eğrisinin bifazik U şeklinde olmasından optimal dozların çok düşük ve çok yüksek olduğu anlaşılmıştır [10, 82]. Ancak mevcut yanıt kriterlerinin konvansiyonel kemoterapötiklere göre tasarlanmış olması nedeniyle, bu oranın aslında daha yüksek olabileceği ve antianjiyojenik ilaçlar için ayrı değerlendirme kriterlerinin geliştirilmesi gerektiği konusunda fikirler öne süren gruplar mevcuttur [102].

Endostatinin hücre çoğalması, göçü ve vaskülojenezi engelleyip endotel hücrelerinin apoptozisini arttırdığı bilinmektedir [86, 103]. Endostatin, hücreler

üzerinde dışavurulan $\alpha 5\beta 1$ -integrine bağlanarak kinazların fosforilasyonunu ketlemek suretiyle hücre göçünü baskılamaktadır [3, 10, 21, 23, 25, 103, 104].

E-selektine bağlanmak ve MMP-2, 9 ve 13'ün etkinliğini engellemek, endostatinin birçok antianjiyojenik etki yollarından bazılarıdır [105].

Endostatinin farklı bölgelerdeki yerel özelliklere bağlı olarak farklı hedeflere bağlanma kapasitesi mevcuttur. Heparine bağlanma özelliği sayesinde hücre yüzeyine de ilginiği vardır. NH₂-ucunda 27 aminoasitlik aktif merkezinde bulunan bir çinko atomu sayesinde heparinle kompleks oluşturarak antitümöral ve antimigratuvar etki gösterebilmektedir. Kollajenöz olmayan bölgesi ise laminin ile ilginiğini sağlamaktadır [104].

Fare ve insan endostatin yapılarının %90'dan fazla benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Farelerde serum ve idrar derişimleri sırasıyla 120±12 ng/ml ve 22±13 ng/ml olarak gösterilmiştir. Beyin, iskelet kası, kalp, böbrek, testis ve karaciğer gibi organlarda ise 0,3-2,0 µg/ml miktarlarında (sırasıyla artarak) bulunduğu saptanmıştır [92]. Endotel hücreleri üzerindeki etkili ketleme derişiminin farelerde 3x10⁻⁹ M'dan daha yüksek değerlerde olduğu saptanmıştır [93]. Doku ve serum derişimleri arasında fark olmasının, hücre dışı matrikste depolanan endostatinin proteolitik yıkımı sonucu seruma yıkanması ile olduğu düşünülmektedir [3]:

İlginiç nokta olarak, Down sendromlu bireylerde Kollajen 18'in 3 kopyası bulunduğu için diğer insanlara göre serum endostatin düzeylerinin 1,6 ila 2,0 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu kişilerde testis karsinomları ve megakaryositik lösemiler dışında diğer bütün tümörler genel toplum ensidansının %10'u kadardır. Ek olarak, diabetes mellitus insidansı bu kişilerde genel popülasyonla aynı olmasına karşın, diyabetik retinopatinin hiç görülmediği bildirilmiştir [10].

Aterosklerotik plak gelişiminin, endostatin tedavisi ile %85 oranında engellendiği deneysel olarak gösterilmiştir [10].

Yine deneysel çalışmalarda endostatinin farklı dokulara (subkütan doku, karaciğer ve akciğer) implante edilmiş kolon ve renal karsinom dokusunun gelişimini ketlediği gösterilmiştir [81].

Hepatosellüler karsinomlu hastalarda preoperatif dönemdeki serum endostatin düzeyinin sağkalım oranlarıyla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı ilişki VEGF ve FGF gibi anjiyojenik etken düzeylerinde de saptanmıştır [46, 106]. Hepatoselüler karsinomlu hastalardan COL18 düzeyi daha düşük olanlarda tümör çapının daha büyük olduğu ve daha yüksek mikrovasküler yoğunluğa sahip oldukları bildirilmiştir [75]. Buna karşılık, başka bir çalışmada yüksek COL18 düzeyi ile birlikte yüksek VEGF düzeyi olan hastalar için daha düşük sağkalım bulunmuş ve hastalık nüksü ile arasında doğru orantı saptanmıştır [107].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Protokolü

Bu çalışma HÜTF Bilimsel Araştırma Birimi tarafından sağlanan finansal destek ile hazırlanmıştır (proje numarası: **012 D06 101 013**).

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilen çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yetiştirilen, ağırlıkları 230-320 gr arasında değişen, standart laboratuvar yemi ile beslenen, 64 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlar kullanılmıştır. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 30.03.2012 tarih, 2012/6 kayıt ve 2012/6-1 karar numaralı izni alınmıştır.

Deney protokolünde sıçanlar her grupta 8'er sıçan olacak şekilde 8 alt gruba ayrıldı. Gruplar 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21. gün grupları olarak belirlendi.

Grup 1 (Sham grubu): Laparotomi sonrası, karaciğerde endostatin ve rejenerasyon, kanda ise endostatin ve VEGFR-2 düzeyleri değerlendirilmiştir.

Diğer bütün gruplarda: %70 hepatektomi sonrası kalan karaciğerde rejenerasyon, endostatin, ve VEGFR-2 reseptör düzeyleri değerlendirilmiştir.

Her grupta sakrifikasyon hemen öncesinde alınacak şekilde tam kan örneği (5 ml) alınıp sistemik VEGF ve endostatin düzeyleri ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Tam kan örnekleri 1000 rpm'de 4 dakika santrifuj edilip ayrılan serumları -80° C sıcaklığında derin dondurucuda saklanmıştır.

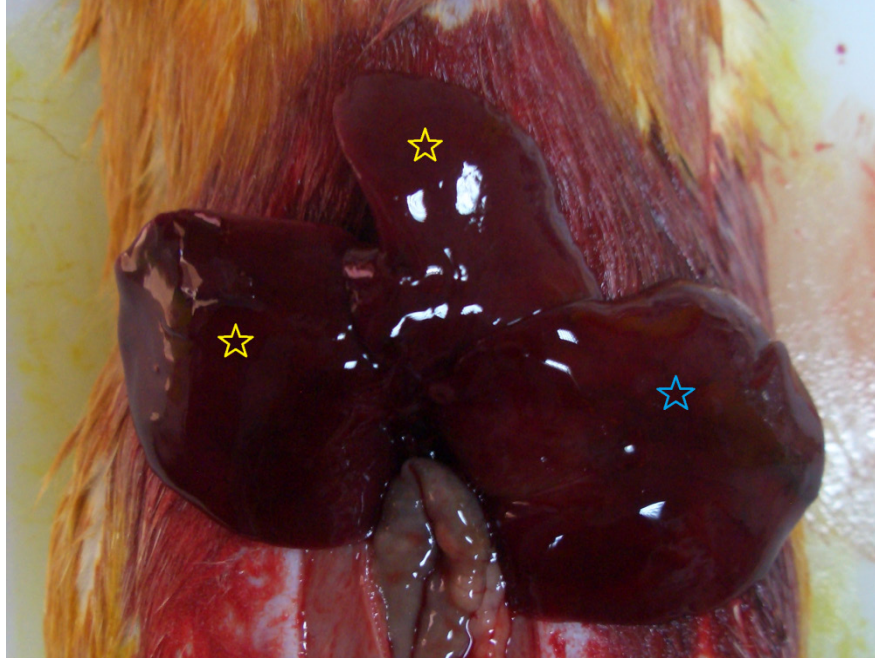
Deney hayvanları oda sıcaklığında, 12 saatlik gündüz/gece döngüsünde tutulmuştur. Normal musluk suyu ve standart sıçan yemi ile beslenmiştir.

3.2. Anestezi

Tüm cerrahi gruplar için genel anestezi, 5 mg/kg xylazine (Alfazyne - %2) ve 90 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar - %5) karışımı intraperitoneal verilerek sağlanmıştır.

3.3. Cerrahi Teknik

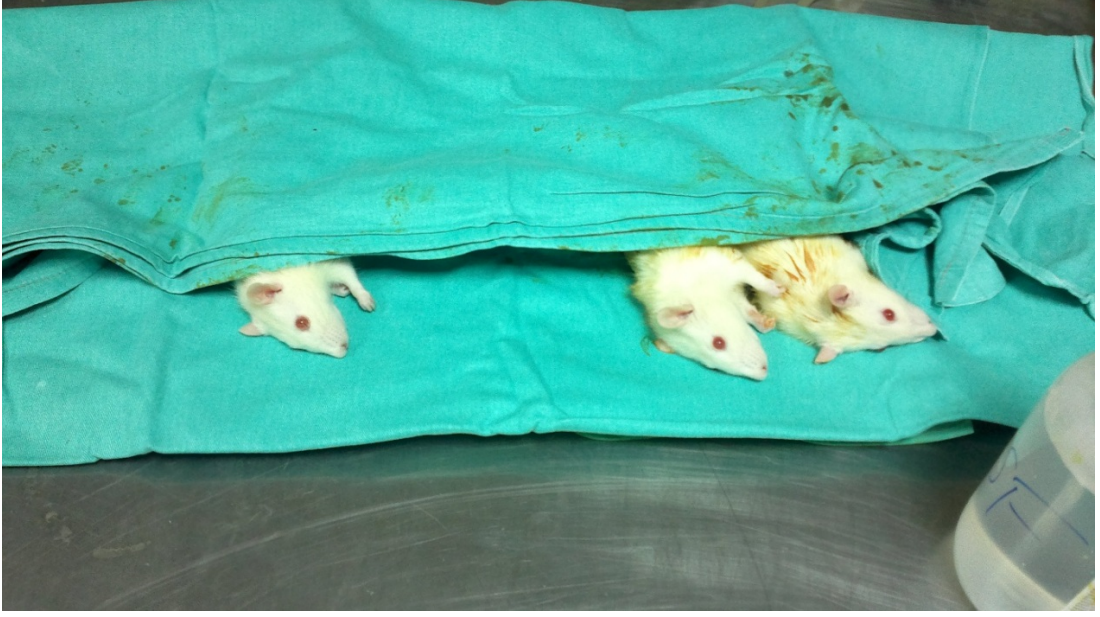
Aseptik şartlarda 2 cm'lik orta hat laparatominin ardından, Higgins ve Anderson'un tanımlamış olduğu [108] karaciğer sol anterior ve median loblarının pedikülleri, koroner, sol lateral ve gastrohepatik ligamentler serbestleştirildikten sonra 2/0 ipek ile bağlanıp rezeksiyon yapılmıştır.



Şekil 3.1. Hepatektomi sırasında eksize edilecek olan KC median (iki sarı yıldız) ve sol anterior lob (mavi yıldız) görünümü

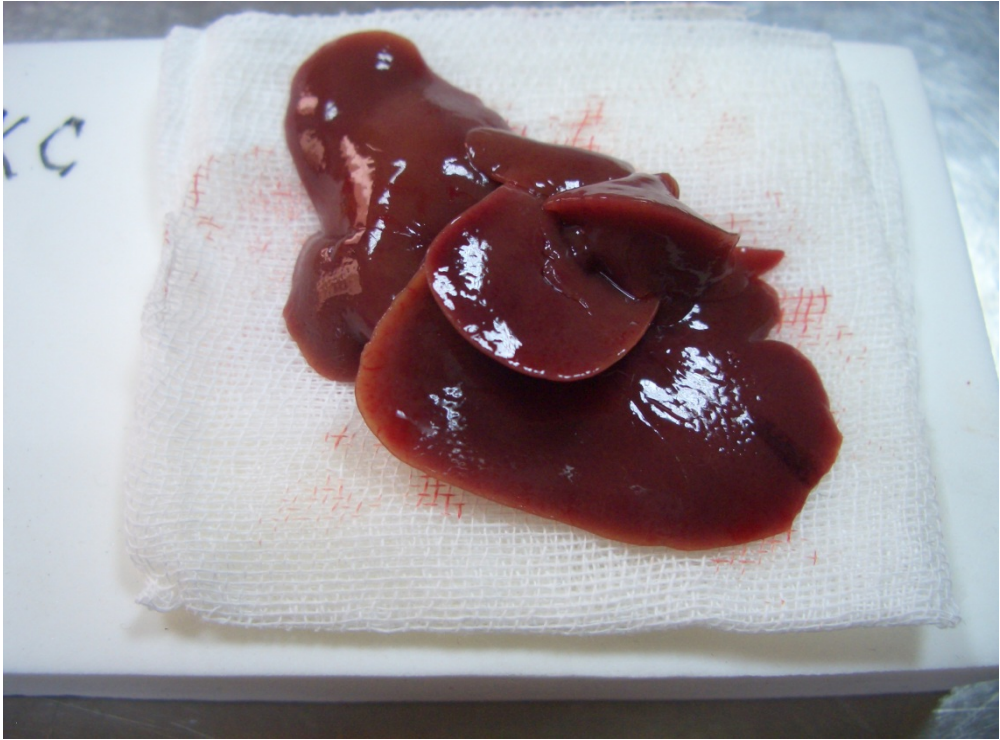
Hepatektomi sonrası geride kalan karaciğer dokusu kanama ve konjesyon açısından kontrol edilmiştir.

Karın içine 10 ml'lik %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu verilerek karın orta hattı 3/0 ipek ile 2 sıra şeklinde kapatılmıştır. Postoperatif analjezi bupivakain (Marcaine - %0.5) %0,25'lik solüsyonla, 2,5 mg/kg dozunda ile bir defaya mahsus olacak şekilde subkütan yolla sağlanmıştır. İşlem sonrası sıçanlar anestezi etkisi ortadan kalkıncaya kadar etüv aletinde standart sıcaklıkta tutulmuştur.



Şekil 3.2. Hepatektomi için anestezi verilmiş şıçanlar

Karaciğer spesmenleri %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edildi.



Şekil 3.3. On dördüncü günde sakrifikasyon sonucu çıkarılan tam rejenerasyona uğramış karaciğer

3.4. Karaciğer Rejenerasyonunun Belirlenmesi

Sıçan karaciğerleri, hepatektomi sonrası 1 gün boyunca %10 luk formaldehit solüsyonu içinde bekletilmiştir. Daha sonra en geniş yüzeyleri görülecek şekilde biyopsi alınmıştır. Rutin doku takibi yapılarak parafin bloklar elde edildikten sonra parafin bloklardan 4 µm kalınlığında boyasız kesitler hazırlanarak Ki-67 immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır:

1. Kesitler 75 °C de 40 dakika deparafinize edildi.
2. Sırasıyla ksilen ve alkolde 10'ar dakika bekletildi.
3. %3'lik hidrojen peroksitte 15 dakika peroksidaz blokaj yapıldı. Çeşme suyuyla yıkandı.
4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*):
 - a) %10'luk sitrat solüsyonu antijen retrieval için hazırlandı.
 - b) Kesitler basınçlı tencerede antijen retrieval solüsyonu ile 3 dakika kaynatıldı.
 - c) Süre bitiminde akan musluk suyuyla kesitler yıkandı.
5. %5'lik PBS solüsyonu ile tekrar yıkandı.
6. 10 dakika içinde protein blokajı yapıldı.
7. 3 kez %5'lik PBS ile yıkandı.
8. Ki-67 antikoru damlatıldı (Ki-67 antibody [SP6] – Proliferation marker (ab16667), 500µl at mg/ml; rabbit monoclonal; anti-Rat, Abcam PLC, Cambridge, UK) ve 1 saat.bekletildi.
9. %5'lik PBS ile herbiri 3 kez yıkandı.
10. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki streptavidin ile 10 dakika bekletildi.
11. %5'lik PBS ile herbiri 3'er kez yıkandı.
12. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki biotin ile 10 dakika bekletildi.

13. Herbiri PBS'de 5'er dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

14. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki DAB kromojende renklenme görülene kadar (5-10 dakika) bekletildi.

15. Musluk suyu ile bolca yıkandı.

16. Hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Musluk suyuyla yıkandı.

17. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp 10 dakika bekletildi, camlar kurumaya bırakıldı. Balsam ile kapatıldı.

Kesitler Ki-67 boyası ile boyanamaması üzerine mevcut olan kesitler PCNA boyası ile boyanmıştır.

1. Kesitler 75 °C de 40 dakika deparafinize edildi.

2. Sırasıyla ksilen ve alkolde 10'ar dakika bekletildi.

3. %3'lik hidrojen peroksitte 15 dakika peroksidaz blokaj yapıldı. Çeşme suyuyla yıkandı.

4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*):

a) %10'luk sitrat solüsyonu antijen retrieval için hazırlandı.

b) Kesitler basınçlı tencerede antijen retrieval solüsyonu ile 3 dakika kaynatıldı.

c) Süre bitiminde akan musluk suyuyla kesitler yıkandı.

5. %5'lik PBS solüsyonu ile tekrar yıkandı.

6. 10 dakika içinde protein blokajı yapıldı.

7. 3 kez %5'lik PBS ile yıkandı.

8. Takara PCNA Ab-1 antikoru damlatıldı (NeoMakers' (Cat. #MS-106-P), Labvision Corporation, Fremont, California, ABD) ve 1 saat bekletildi.

9. %5'lik PBS ile herbiri 3 kez yıkandı.

10. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki streptavidin ile 10 dakika bekletildi.

11. %5'lik PBS ile herbiri 3'er kez yıkandı.

12. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki biotin ile 10 dakika bekletildi.

13. Herbiri PBS'de 5'er dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

14. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki DAB kromojende renklenme görülene kadar (5-10 dakika) bekletildi.

15. Musluk suyu ile bolca yıkandı.

16. Hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Musluk suyuyla yıkandı.

17. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp 10 dakika bekletildi, camlar kurumaya bırakıldı. Balsam ile kapatıldı.

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

3.5. Anjiogenezin Belirlenmesi

Sıçan karaciğerleri hepatektomi sonrası 1 gün boyunca %10 luk formaldehit solüsyonu içinde bekletildi. Daha sonra en geniş yüzeyleri görülecek şekilde biyopsi alındı. Rutin doku takibi yapılarak parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında boyasız kesitler hazırlanarak VEGFR-2 immünohistokimyasal yöntemle aşağıda belirtildiği gibi boyanmıştır:

1. Kesitler 75 °C de 40 dakika deparafinize edildi.

2. Sırasıyla ksilen ve alkolde 10'ar dakika bekletildi.

3. %3'lik hidrojen peroksitte 15 dakika peroksidaz blokaj yapıldı. Çeşme suyuyla yıkandı.

4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*):

a) %10'luk sitrat solüsyonu antijen retrieval için hazırlandı.

b) Kesitler basınçlı tencerede antijen retrieval solüsyonu ile 3 dakika kaynatıldı.

c) Süre bitiminde akan musluk suyuyla kesitler yıkandı.

5. %5'lik PBS solüsyonu ile tekrar yıkandı.

6. 10 dakika içinde protein blokajı yapıldı.

7. 3 kez %5'lik PBS ile yıkandı.

8. Abcam VEGFR-2 antikoruna damlatıldı (anti-VEGFR-2 antibody – hemangioblast marker ab2349, 500µl at mg/ml; rabbit polyclonal; anti-Rat, Abcam PLC, Cambridge, UK) ve 1 gece ('overnight') bekletildi.

9. %5'lik PBS ile herbiri 3'er kez yıkandı.

10. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki streptavidin ile 10 dakika bekletildi.

11. %5'lik PBS'de herbiri 3 kez bekletildi.

12. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki biotin ile 10 dakika bekletildi.

13. PBS'de herbiri 5 dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

14. Acu-Stain™ Mouse + Rabbit HRP Kit (Genemed Biotechnologie, 458 Carlton Court, South San Francisco, CA 94080)'deki DAB kromojende renklenme görülene kadar (5-10 dakika) bekletildi.

15. Musluk suyu ile bolca yıkandı.

16. Hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Musluk suyuyla yıkandı.

17. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp 10 dakika bekletildi, camlar kurumaya bırakıldı. Balsam ile kapatıldı.

Değerlendirme; VEGFR-2 reseptörüne karşı immünohistokimyasal boyanması perivasküler (periportal, perisantral, perisinüzoidal) alanlarda değerlendirilmiştir. Pozitif boyanması olan hücreler damar çevresinde tek sıra oluşturduğunda +1, 2 sıra oluşturduğunda +2, daha fazla sıra oluşturduğunda +3 olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirilen kesit boyunca ortalama ekspresyon alınarak ortalama ekspresyon derecesi olarak kaydedilmiştir.

3.6. Antianjiogenezin Belirlenmesi

Sıçan karaciğerleri hepatektomi sonrası 1 gün boyunca %10 luk formaldehit solüsyonu içinde bekletildi. Daha sonra en geniş yüzeyleri görülecek şekilde biyopsi alındı. Rutin doku takibi yapılarak parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında boyasız kesitler hazırlanarak antianjiogenez yanıtının karaciğer matriksindeki endostatin ekspresyonunun değerlendirilmesi için immünohistokimyasal yöntemle aşağıda belirtildiği gibi boyanmıştır:

1. Kesitler 75 °C de 40 dakika deparafinize edildi.
2. Sırasıyla ksilen ve alkolde 10'ar dakika bekletildi.
3. %3'lik hidrojen peroksitte 15 dakika peroksidaz blokaj yapıldı. Çeşme suyuyla yıkandı.
4. Antijenlerin ortaya konulması (*retrieval*):
 - a) %10'luk sitrat solüsyonu antijen retrieval için hazırlandı.
 - b) Kesitler basınçlı tencerede antijen retrieval solüsyonu ile 3 dakika kaynatıldı.
 - c) Süre bitiminde akan musluk suyuyla kesitler yıkandı.
5. %5'lik PBS solüsyonu ile tekrar yıkandı.
6. 10 dakika içinde protein blokajı yapıldı.
7. 3 kez %5'lik PBS ile yıkandı.
8. Abcam Anti-Endostatin antikoru damlatıldı (Anti-Endostatin antibody [4i37] –ab64569, 100µl at 0.1mg/ml; Mouse monoclonal; anti-Rat, Abcam PLC, Cambridge, UK) ve 1 gece ('overnight') bekletildi.

9. %5'lik PBS ile herbiri 3'er kez yıkandı.

10. Mouse specific HRP/DAB detection IHC Kit (Abcam PLC, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom (ab64259))'deki streptavidin ile 10 dakika bekletildi.

11. %5'lik PBS'de herbiri 3'er kez bekletildi.

12. Mouse specific HRP/DAB detection IHC Kit (Abcam PLC, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom (ab64259))'deki biotin ile 10 dakika bekletildi.

13. PBS'de herbiri 5'er dakika olacak şekilde 3 kez bekletildi.

14. Mouse specific HRP/DAB detection IHC Kit (Abcam PLC, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom (ab64259))'deki DAB kromojende renklenme görülene kadar (5-10 dakika) bekletildi.

15. Musluk suyu ile bolca yıkandı.

16. Hematoksilen ile 30 saniye zıt boyama yapıldı. Musluk suyuyla yıkandı.

17. Alkolden geçirildi, kurutuldu ve ksilene alınıp 10 dakika bekletildi, camlar kurumaya bırakıldı. Balsam ile kapatıldı.

Değerlendirme; endostatin immünohistokimyasal boyanması perisinüzoidal matriksteki boyanma şiddetine ve boyanan alanların sıklığına göre şu şekilde sıralanmıştır:

- a. Bütün alanlarda çok zayıf boyanma ya da tek alanda orta kuvvetli boyanma - +1
- b. Bütün alanlarda orta şiddetli boyanma ya da birkaç alanda kuvvetli boyanma - +2
- c. Bütün alanlarda homojen kuvvetli boyanma - +3
- d. Bütün alanlarda homojen çok kuvvetli boyanma - +4

Değerlendirilmeye alınan alanlar kesit kenarları, artefakt veya nekroz alanlarından uzakta olanlarından seçilmiştir.

3.7. Sistemik Anjiogenezin Belirlenmesi

Sistemik VEGF düzeyi her hayvan grubunda ELISA yöntemi ile VEGF Rat ELISA Kit (ab100787 – 1x96 Well Plate, Abcam PLC, 330 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0FL, United Kingdom) ürünü kullanılarak değerlendirildi.

Ürünün talimatına göre hazırlanışı:

- a. Sample dilüent distile su ile 5 kat dilüe edildi
- b. Assay dilüent distile su ile 5 kat dilüe edildi.
- c. Standart solüsyon hazırlanışı:
 - o Standart şişesine 400 µl dilüe edilmiş sample dilüent (50 ng/ml)'ten 10 µl alınıp 990 µl sample dilüent buffer içine konulup karıştırıldı (elde edilen standart solüsyon konsantrasyonu 500 pg/ml).
 - o Seri dilüsyon süresince 10 adet solüsyon standartı elde edilip (0 ile 500 pg/ml arasında) kuyucuklara konuldu.
- d. Yıkama bufferi hazırlanışı:
 - o 20 ml yıkama bufferi ile 400 ml distile su karıştırıldı.
- e. Tespit antikorun 100 µl'si assay dilüentinde 80 kat oranında çözülür.
- f. HRP-Streptavidin'in 100 µl'lik miktarı 12 ml'lik assay dilüenti ile (120 kat dilüsyon elde edilmiş oldu) karıştırılır.

Test çalışma yöntemi:

- a. Reagentle örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- b. 100 µl standart solüsyonla örnekler kuyucuklara (well plate) yerleştirildi. İnkübasyon 2.5 saat boyunca oda sıcaklığında yavaş karıştırıcıda gerçekleştirildi.
- c. Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.
- d. 100 µl hazır biotin antikorunu konup 1 saat oda sıcaklığında yavaş karıştırıcıda bekletildi.
- e. Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı.

- f. 100 µl hazır streptavidin solüsyonu eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında yavaş karıştırıcıda inkübe edildi.
- g. 4 kez yıkandı.
- h. 100 µl TMB substrat solüsyonu kondu. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika yavaş karıştırıcıda inkübe edildi.
- i. 50 µl stop solüsyonu konup hazırlanan programda spektrofotometrede okundu.

3.8. Sistemik Antianjiogenezin Belirlenmesi

Sistemik Endostatin düzeyi her hayvan grubunda ELISA yöntemi ile Rat Endostatin, ES ELISA Kit ((CSB-E07975r) – 1x96 Well Plate, Cusabio PLC, Incubator Building 4th floor, Wuhan University Science Park, No.1-1, Daxueyuan Road, Donghu Hi-Tech Development Area, Wuhan, Hubei Province 430223, P.R.China) ürünü kullanılarak değerlendirildi.

Ürünün talimatına göre hazırlanışı:

- a. Biotin antikoru kullanılmadan önce santrifuj edildi. 100 kat dilüsyon için 10 µl biotin antikoru 990 µl dilüent solüsyonu ile karıştırıldı.
- b. HRP-avidin kullanılmadan santrifuj edildi. 100 kat dilüsyon için 10 µl HRP-avidin 990 µl dilüent solüsyonuyla karıştırıldı.
- c. Yıkama bufferinin 25 kat dilüe edilmesi için 20 ml bufferle 500 ml distile su karıştırıldı.
- d. Standart solüsyon 30 sn 6000-10000 rpm'de santrifuj edildikten sonra üzerine 1 ml sample dilüent eklenir. Stock standart'ın konantrasyonu 400 ng/ml oldu.
- e. Seri dilüsyon yapılp 8 standart dilüsyon elde edildi (0 ile 400 ng/ml).

Test çalışma yöntemi:

- a. Reagent ile örnekler oda sıcaklığına getirildi.

- b. 100 µl hazır standart solüsyonları ve örnekler kuyucuklara (well plates) pipetlendikten sonra 2.5 saat 37° C sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama yapılmadan 100 µl biotin antikoru konup 1 saat 37°C’de inkübe edildi.
- c. 3 kez hazır yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- d. 100 µl HRP-avidin konduktan sonra 37°C’de 1 saat inkübe edildi.
- e. 3 kez yıkama yapıldı.
- f. 90 µl TMB substrat konduktan sonra 37°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- g. 50 µl stop solüsyonu konduktan sonra hazırlanan programla spektrofotometrede okutuldu.

3.9. Deney Sonuçlarının Sunulması

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca ve çeyreklerarası aralık değerleri (IQR – interquartile ratio) ile frekans tabloları kullanılarak verildi.

Sakrifiksasyon günleri arasında ölçülen parametreler arasındaki farklar istatistiksel olarak dağılım özellikleri ve değişken tipine göre aşağıda belirtildiği gibi hesaplanmıştır. Başlangıca (sham grubu) göre değişimler temel hipotez olarak belirtilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için düzeltme uygulanmamıştır.

Kandaki VEGF ve endostatin değerlerinin normal dağılıma uygunluğu incelenmiş ve normal dağılım gösterdikleri bulunmuştur. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama ve standart sapmalar kullanılarak verildi. VEGF ve endostatinin kandaki düzeyleri deney altgrupları (sakrifikasyon gününe göre) arasındaki farklar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak karşılaştırıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. P-değerinin 0.05’nin altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc Dunnet testi kullanıldı.

Dokudaki VEGFR-2 ve endostatin ekspresyonu ordinal değişkenler olduğu için gruplar arasındaki farklar Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

Kandaki VEGF düzeyi ile dokudaki VEGFR-2 ekspresyonu arasındaki ilişkiler için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman testi ile hesaplandı (doku VEGFR-2 ekspresyonu değişkeninin ordinal olması nedeniyle).

Kandaki endostatin ile dokudaki endostatin ekspresyonu arasındaki ilişkiler için korelasyon katsayıları ve istatistiksel anlamlılıklar Spearman testi ile hesaplandı (endostatin doku ekspresyonu değişkeninin ordinal olması nedeniyle). İstatistiksel anlamlılık için tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Rejenerasyon Değerleri

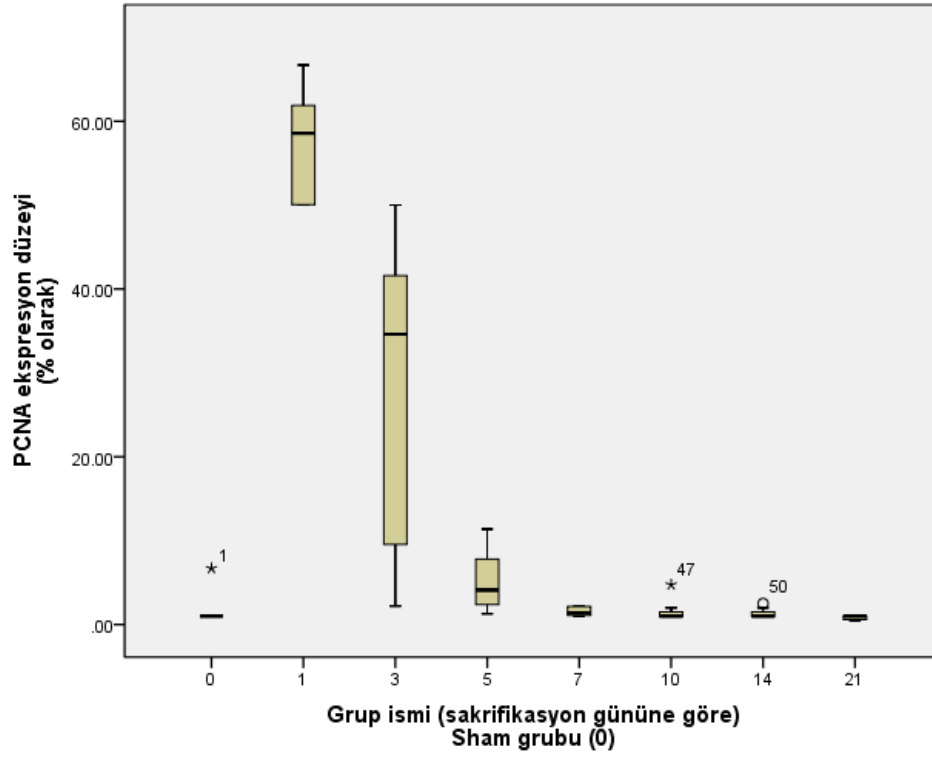
Çalışmamızda rejenerasyonun belirlenmesi için planlanan immünohistokimyasal boyanın (Abcam Ki67 antibody [SP6] – proliferation Marker (ab16667) – 500µl at mg/ml) uygulanan her türlü yöntemle rağmen çalışmaması üzerine değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Kontrol preparatlar ‘proliferating cell nuclear antigen’ (PCNA) antikoruna boyası kuvvetli pozitif boyanma gösterince bütün gruplar bu antikorla değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.1.’de** özetlenmiştir. Birinci gün grubunda ekspresyon ortalaması %57.21 olup sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiştir ($P < 0.05$). Üçüncü gün grubunda ortalama ekspresyon %27.96 olup anlamlı fark göstermiştir ($P < 0.05$). Beşinci günde ortalama %5.15 değerine düşüp istatistiksel anlamsız düzeye ulaşmıştır ($P = 0.87$).

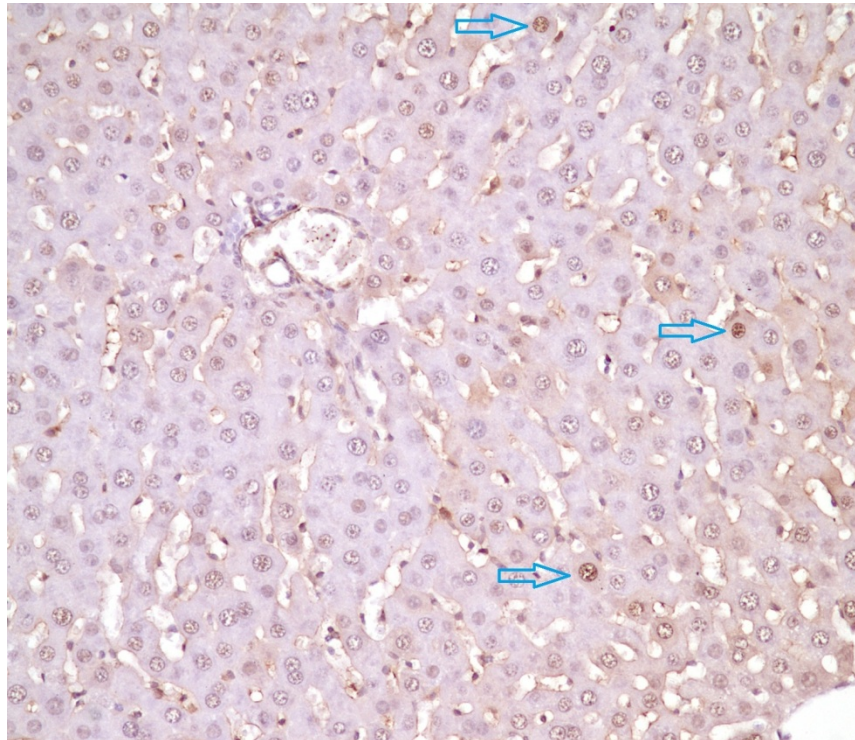
Tablo 4.1. PCNA ekspresyonu düzeyi

| | | Deney grubu | | | | | | | |
|----------------------------|--------------|-------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| | | Sham | 1.gün | 3.gün | 5.gün | 7.gün | 10.gün | 14.gün | 21.gün |
| PCNA ekspresyon düzeyi (%) | Ortalama (%) | 1.71 | 57.21 | 27.96 | 5.15 | 1.56 | 1.59 | 1.31 | 0.83 |
| | Ortanca (%) | 1.00 | 58.55 | 34.60 | 4.11 | 1.40 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |
| | P-değeri | | <0.05 | <0.05 | 0.87 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 |

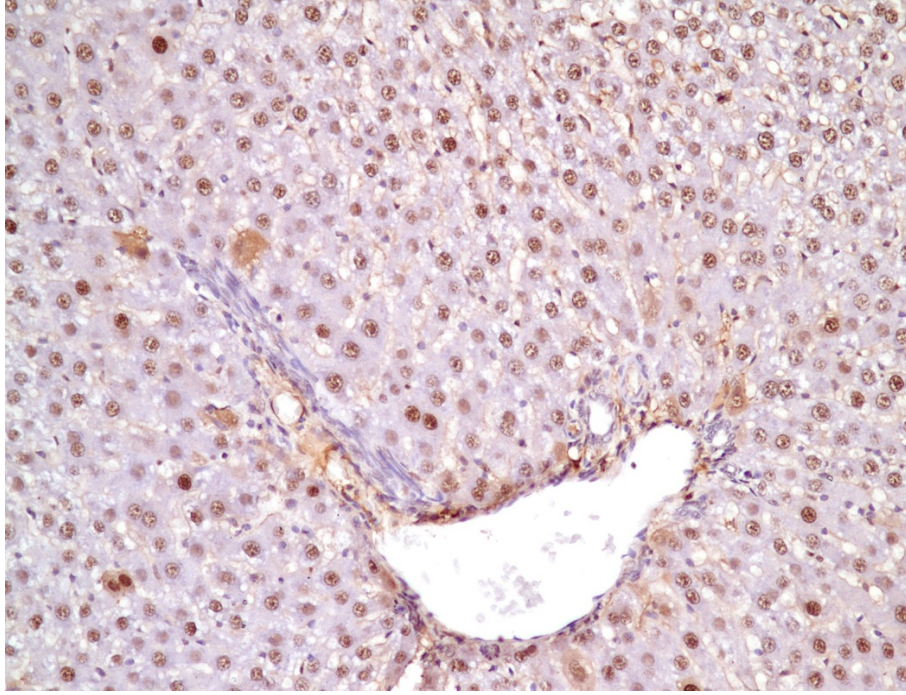
Tablo 4.1.’de 1., 3. ve 5. günler dışındaki gruplara ait vaka sayısı düşük olduğundan ideal düzeyde değerlendirilememiştir. Ancak gruplar görsel olarak değerlendirildiğinde çalışmamızdaki rejenerasyon değerleri Doğrul ve ark’nın yaptıkları çalışma ile benzer eğilim göstermiştir (**Şekil 4.1., 4.2., 4.3.**).



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



Şekil 4.2. PCNA'nın %1'den az ekspresyonu (mavi okla işaretli)



Şekil 4.3. PCNA'nın %90'dan yüksek ekspresyonu

4.2. Anjiogenez Değerleri

Deneklerde *anjiogenezin sistemik* düzeyi tam kan örneklerinden elde edilen serumda *VEGF* molekülü konsantrasyonu ölçülerek değerlendirildi (**Tablo 4.2.**).

Tablo 4.2. Sıçanların sakrifikasyon öncesi alınan kan örneklerindeki VEGF molekülünün düzeyi ve gruba göre dağılımı

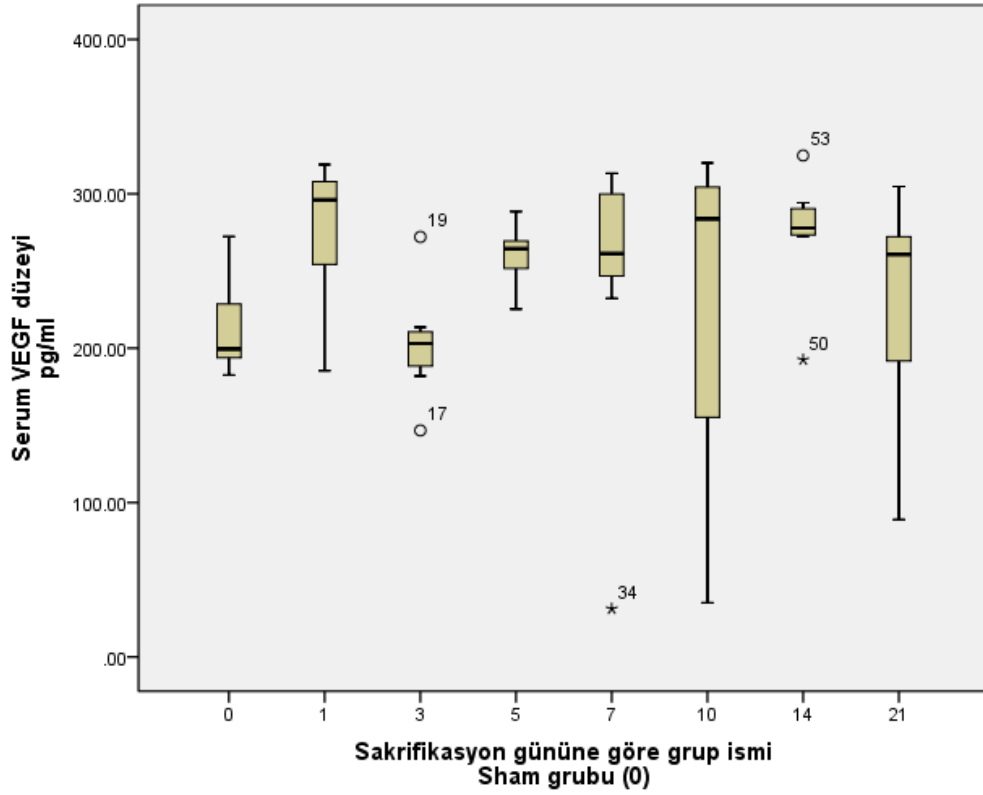
| VEGF kandaki değer (pg/ml) | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Sıra | | | | | | | | |
| 1 | 199.55 | 299.79 | *** | 267.92 | *** | 80.18 | 280.21 | 273.54 |
| 2 | 182.65 | 273.75 | 213.64 | 288.54 | 232.32 | 282.50 | 324.79 | 252.50 |
| 3 | 212.37 | 294.17 | 203.03 | 250.21 | 31.15 | 320.00 | 272.50 | 168.70 |
| 4 | 244.95 | 318.96 | 194.81 | 265.21 | 261.25 | 297.71 | 294.17 | 88.94 |
| 5 | 193.20 | 185.42 | 146.71 | 225.25 | 313.33 | 311.04 | 275.42 | 214.65 |
| 6 | 199.55 | 316.04 | 272.08 | 270.83 | 301.88 | 230.30 | 274.17 | 270.83 |
| 7 | 194.55 | 234.85 | 182.03 | 263.75 | 261.25 | 285.00 | 286.67 | 304.79 |
| 8 | 272.29 | 297.92 | 207.58 | 253.13 | 297.92 | 35.11 | 192.49 | 268.96 |
| Ortalama | 212.39 | 277.61 | 202.84 | 260.60 | 242.73 | 230.23 | 275.05 | 230.36 |
| Ortanca | 199.55 | 296.05 | 203.03 | 264.48 | 261.25 | 283.75 | 277.82 | 260.73 |
| Standart sapma | 30.59 | 45.84 | 37.82 | 18.45 | 97.54 | 110.49 | 37.46 | 70.78 |
| P-değeri^^ | | 0.21 | 1.00 | 0.51 | 0.90 | 0.99 | 0.25 | 0.99 |

*** Anlamsız değer

^^ istatistiksel anlamlılık sham (0) grubuna göre hesaplanmıştır

Her grubun denekleri için serum VEGF düzeyi ortalama ve ortanca değerleri, standart sapma değerleri **Tablo 4.2.'de** gösterilmiştir. Deney gruplarının değerleri sham grubuna göre değişikliklerin istatistiksel anlamlı olup olmaması açısından karşılaştırılmıştır. Hiçbir grup anlamlı fark göstermemekle birlikte ($P>0.21$) grafik yöntemle (**Şekil 4.4.**) değerlendirildiğinde ve denek sayısı göz önüne alındığında VEGF serum düzeyinin bazal seviyesi (sham grubu) nispeten kompakt dağılım gösterip ortancanın 199.55 pg/ml olduğu görülmüştür. İlk yükselme 1. gün grubunda daha heterojen dağılımla ortancası 296.05 pg/ml olacak şekilde gösterilmiştir. Üçüncü gün grubunda dağılım kompakt (IQR dar olma durumu \diamond normal dağılıma daha yakın dispersyona sahip olma durumu) olmakla birlikte medianı 203.03 pg/ml düzeyinde tespit edilmiştir. Dördüncü ve beşinci gün gruplarında VEGF düzeyleri sırasıyla 264.48 ile 261.25 pg/ml değerlerine ulaşmış sonraki grup değerlerine göre daha kompakt olmakla birlikte daha anlamlı olarak yorumlanabilmektedir. Onuncu,

14. ve 21. gün değerleri sırasıyla 283.75, 277.82 ve 260.73 pg/ml olmakla birlikte genel eğilimin azalma yönünde olduğu görülebilmektedir.



Şekil 4.4. Sıçanların deney gruplarına göre kandaki VEGF düzeylerinin grafik gösterimi

Dokudaki anjiogenez değerleri *VEGFR-2* molekülünün ekspresyonuna bakılarak değerlendirilmiştir (**Tablo 4.3.**).

Tablo 4.3. Yüzde 70 hepatektomi sonrası deneklerin doku VEGFR-2 ekspresyonu

| VEGFR-2 doku ekspresyonu | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|--------------------------|-------|--------|--------|--------|-------|---------|---------|---------|
| Sırası | | | | | | | | |
| 1 | 3 | 1 | *** | 1 | *** | 1 | 0 | . |
| 2 | 4 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 3 | 4 | 1 | 1 | 3 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | 4 | 2 | 2 | 3 | 0 | 3 | 2 | 4 |
| 5 | 5 | 2 | 3 | 4 | 0 | 3 | 3 | 4 |
| 6 | 5 | 3 | 3 | 4 | 1 | 4 | 4 | 4 |
| 7 | 8 | 3 | 4 | 5 | 4 | 6 | 5 | 6 |
| 8 | 8 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 7 |
| Ortalama | 5.13 | 2.25 | 2.57 | 3.63 | 1.57 | 3.25 | 2.63 | 4.14 |
| Ortanca | 4.50 | 2.00 | 3.00 | 3.50 | .00 | 3.00 | 2.50 | 4.00 |
| IQR | 4-6.5 | 1-3 | 1-4 | 3-4 | 0-4 | 1.5-5 | 0.5-4.5 | 2-6 |
| P-değeri^^ | | 0.005 | 0.02 | 0.13 | 0.02 | 0.08 | 0.07 | 0.34 |

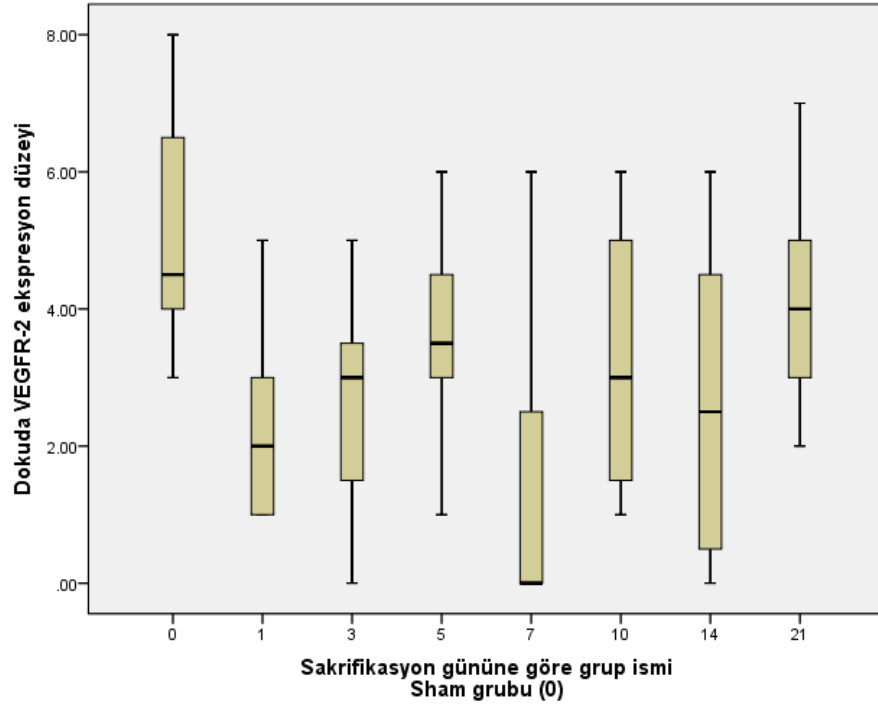
*** Anlamsız değer

^^ istatistiksel anlamlılık sham (0) grubuna göre hesaplanmıştır

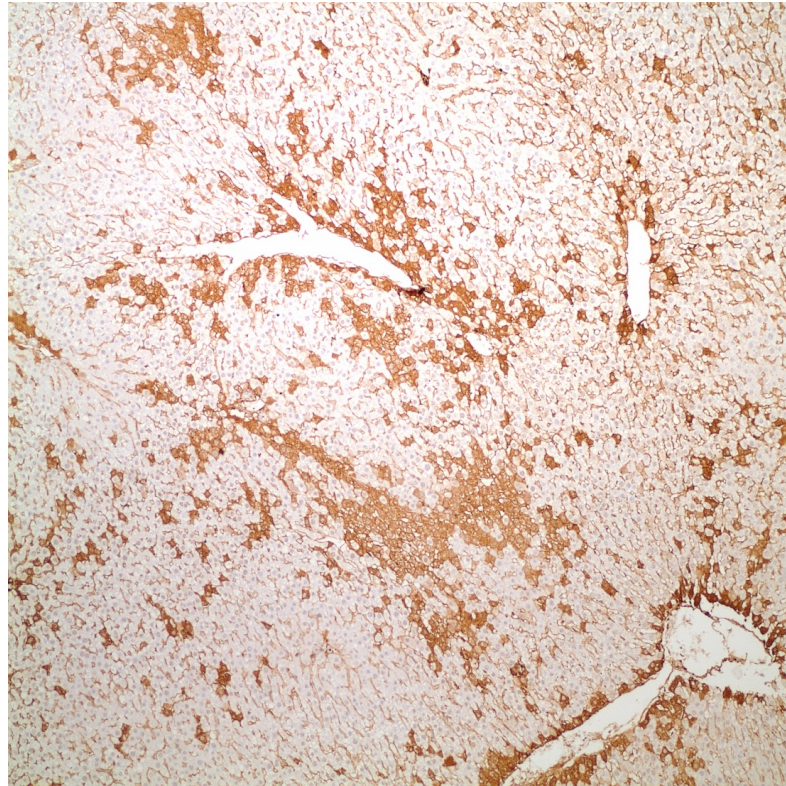
IQR – çeyreklerarası aralık (interquartile range)

Her bir grupta VEGFR-2 doku ekspresyonu sham grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (**Tablo 4.3.**). Sham grubuna ait VEGFR-2 ekspresyonunun ortanca değeri 4.5 bazal değer olarak kabul edilmiştir. 1. gün değerleri 5. güne kadar yükselme eğiliminde olup 5. günde istatistiksel anlamlılık kaybolmaktadır. 7. gününde anlamlı düşüş sonrası reseptör ekspresyonu anlamlı bir şekilde genel eğilim olarak 21. güne kadar neredeyse bazal değere ulaşmaktadır. Bazal değer yüksek olduğundan 5. ve 21. güne ait artışı istatistiksel olarak anlamlı olan bazale dönme eğilimi olarak kabul edebiliriz. Birinci gündeki ekspresyon düşüşünün rölatif olarak artan VEGF’in reseptörüne bağlanmasına bağlı olabilir. Beşinci gündeki ekspresyon artışının anjiogenez süresince artan VEGF reseptörlerinin absöüt miktarı ile ilgili olduğuna yorabiliriz. Yirmibirinci gündeki ekspresyon artışının VEGF bağlayan reseptör sayısının rölatif olarak azalması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

VEGFR-2 ekspresyonu grafik olarak değerlendirilerek reseptör ekspresyonu eğilimleri görselleştirilmiştir (**Şekil 4.5.**).



Şekil 4.5. VEGFR-2 doku ekspresyonunun grafik gösterimi



Görünen 3 damar kesiti santral venlerdir. Etraflarında kuvvetli boyama gösteren ve en az iki sıra boyanmış hücre bulunan alanlar gözlenmektedir.

Şekil 4.6. Perisantral VEGFR-2 kuvvetli boyaması

4.3. Antianjiogenez Aktivitesi Değerleri

Sistemik antianjiogenez deneklerin kandaki *endostatin* düzeyine bakılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.4.).

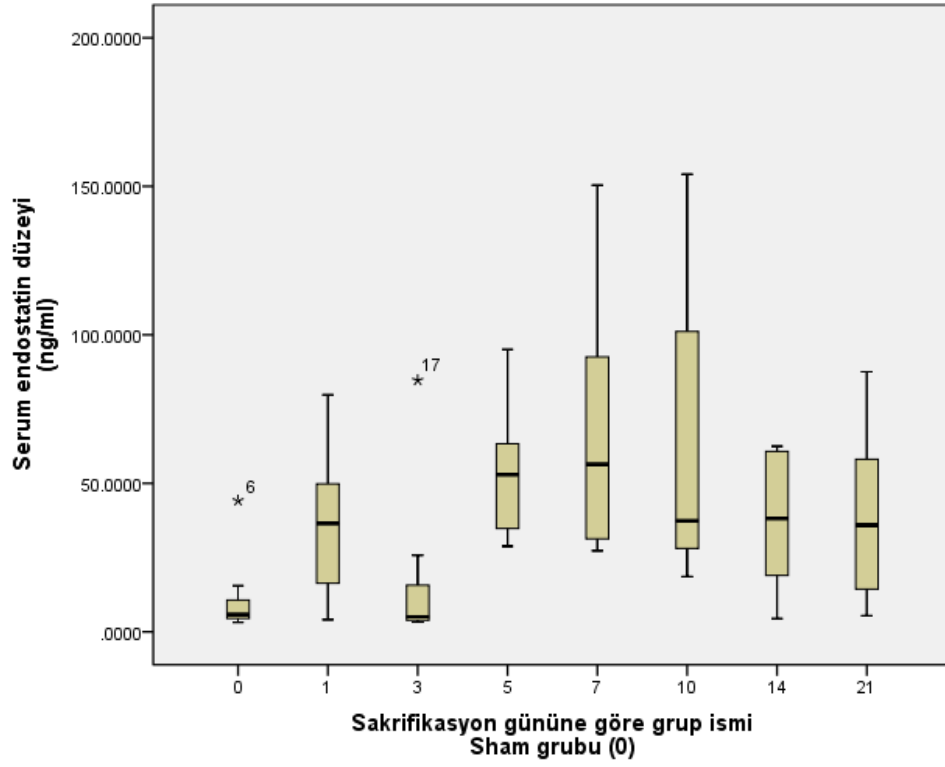
Tablo 4.4. Endostatin molekülünün serumdaki düzeyi ve gruplara göre dağılımı

| Endostatin kan düzeyi (ng/ml) | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| Sırası | | | | | | | | |
| 1 | 3.1876 | 4.12 | *** | 95.09 | *** | 147.95 | 60.377 | 12.946 |
| 2 | 5.7534 | 47.35 | 5.6085 | 61.13 | 94.34 | 20.982 | 5.712 | 36.111 |
| 3 | 5.8775 | 28.16 | 3.229 | 65.47 | 150.41 | 36.111 | 62.453 | 64.528 |
| 4 | 4.367 | 42.42 | 3.2703 | 52.83 | 56.415 | 38.636 | 4.4291 | 87.547 |
| 5 | 4.6567 | 52.26 | 84.717 | 29.42 | 32.702 | 35.227 | 32.323 | 51.698 |
| 6 | 15.476 | 4.51 | 5.1326 | 53.02 | 29.924 | 54.34 | 43.561 | 35.732 |
| 7 | 5.9396 | 79.81 | 25.758 | 28.79 | 90.755 | 18.601 | 32.828 | 5.4223 |
| 8 | 44.192 | 30.56 | 4.5533 | 40.15 | 27.273 | 154.1 | 61.132 | 15.774 |
| Ortalama | 11.18 | 36.15 | 18.90 | 53.24 | 68.83 | 63.24 | 37.85 | 38.72 |
| Ortanca | 5.82 | 36.49 | 5.13 | 52.93 | 56.42 | 37.37 | 38.19 | 35.92 |
| Standard sapma | 13.87 | 25.22 | 30.11 | 21.71 | 45.62 | 55.31 | 23.58 | 28.12 |
| P-değeri^^ | | 0.50 | 0.99 | 0.07 | 0.008 | 0.014 | 0.43 | 0.40 |

*** Anlamsız değer

^^ istatistiksel anlamlılık sham (0) grubuna göre hesaplanmıştır

Endostatinin bazal değeri olarak sham grubuna ait değer kabul edildi. Gruplardaki değişiklikler istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirildi. Birinci günde endostatin düzeyi 36.15 ng/ml'ye ulaşmış istatistiksel anlamlılık göstermemiştir. Üçüncü günde istatistiksel anlamlı olmamakla birlikte 18.90 ng/ml değerine ulaşmış yükselme eğilimine girdiği gözlenmiştir. Sırasıyla 68.83 ve 63.24 ng/ml düzeylerine 7. ve 10. günlerde ulaşmış istatistiksel anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0.014$). On dördüncü ve 21. günde sırasıyla 37.85 ile 38.72 ng/ml düzeylerine düşüş istatistiksel anlamsız ($P > 0.40$) olarak saptanmıştır. Görsel yorumlamaya gelince genel eğilim aynı kalmakla birlikte 7. ve 10. gün grubuna ait dağılımlar en heterojen gruplar olarak öne çıkmaktadır (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Sıçanların sakrifikasyon gruplarına göre endostatin düzeylerinin dağılımı

Doku endostatin ekspresyonu ortalama, ortanca ve çeyreklerarası aralıklar olarak hesaplanıp grup ortancası sham grubununkine göre istatistiksel anlamlı değişiklik açısından değerlendirilmiştir (**Tablo 4.5.**).

Tablo 4.5. Endostatin doku ekspresyonu ve gruplar arasındaki istatistiksel fark

| Endostatin doku ekspresyonu | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|-----------------------------|------|--------|--------|--------|-------|---------|---------|---------|
| Hayvanın sırası | | | | | | | | |
| 1 | 1 | 2 | *** | 0 | *** | 0 | 1 | 0 |
| 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 0 |
| 3 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 |
| 4 | 4 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 |
| 5 | 2 | 3 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| 6 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 0 |
| 7 | 3 | 0 | 2 | 1 | 3 | 0 | 4 | 3 |
| 8 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 2 | 4 |
| Ortalama | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| Ortanca | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| IQR | 2-3 | 2-2 | 1-2 | 0-1 | 1-2 | 1-3 | 2-3 | 0-3 |
| P-değeri^^ | | 0.08 | 0.04 | 0.007 | 0.07 | 0.40 | 0.44 | 0.08 |

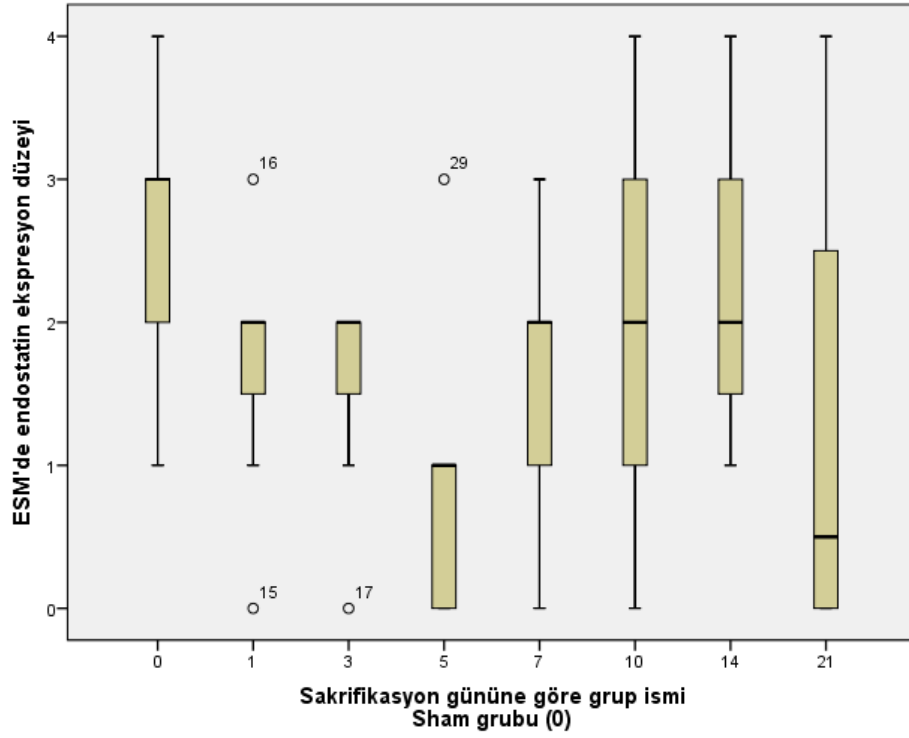
*** Anlamsız değer

^^ istatistiksel anlamlılık sham grubuna göre hesaplanmıştır

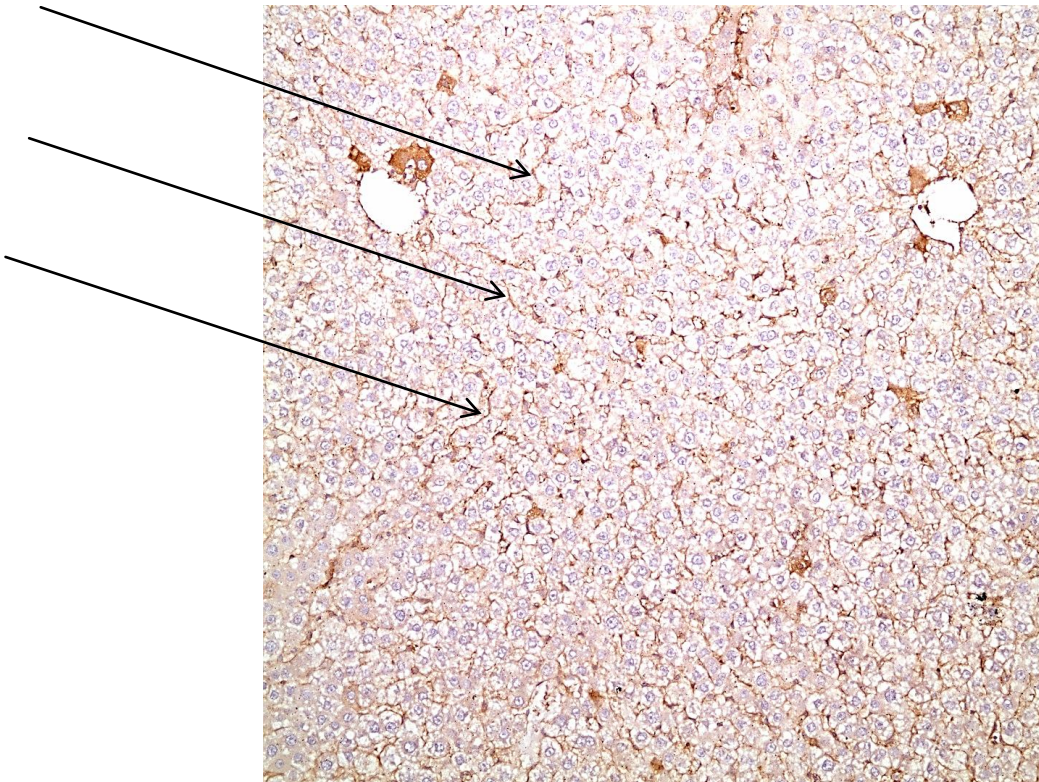
IQR – çeyreklerarası aralık (interquartile range)

Sham grubuna ait bazal değer 3 iken 5. güne kadar düşme eğiliminde olup 3. günde 2'ye inmekle birlikte ilk kez istatistiksel anlamlı fark ($P = 0.04$) kazanmaktadır. Beşinci günde de ekspresyon değeri 1'e inip istatistiksel anlamlı kalmaktadır ($P = 0.007$). Yedinci ile 14. günler arasında dağılım yüksek iken genel eğilim artma yönünde olup 21. günde yine yüksek dağılım göstermekte ve hem ortanca hem de ortalama düşmektedir. Onuncu günden itibaren değerler bazale yaklaşım büyük ihtimalle dağılım özellikleri nedeniyle anlamsız düzeye ulaşmaktadır ($P > 0.08$).

Bahsedilen durum grafik yöntemle değerlendirildiğinde genel eğilim daha net gözlenmektedir (**Şekil 4.8.**).



Şekil 4.8. Ekstrasellüler matrikste endostatin ekspresyonunun grafik ifadesi



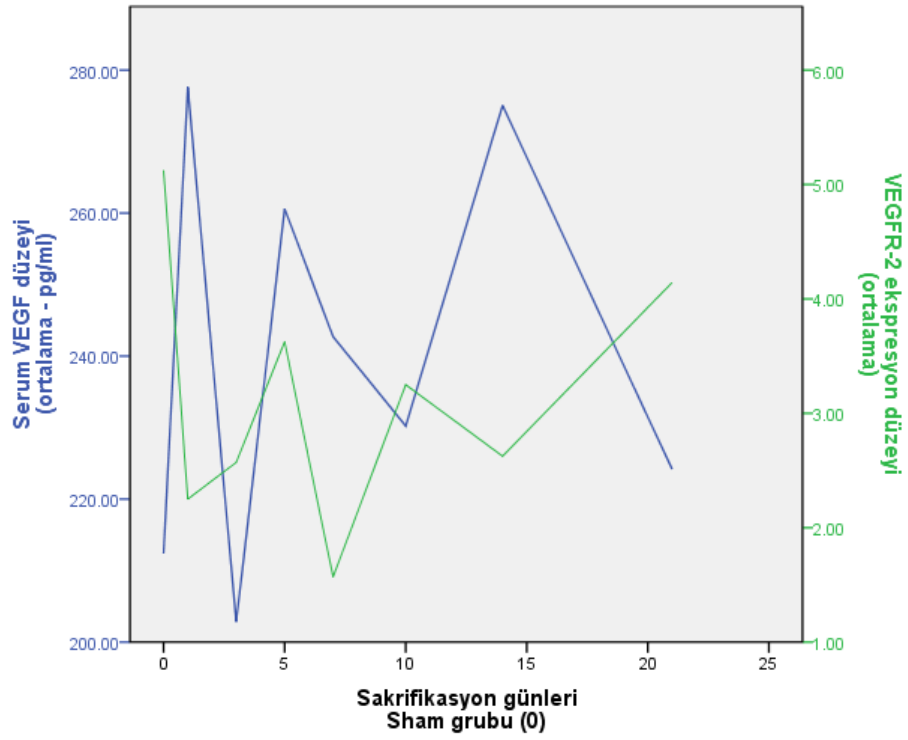
Bu şekilde yaygın kollabe sinüzoidler kahverengi çizgiler şeklinde görülebilir (örnekleri okla işaretli). İki damar kesiti santral venlerden oluşmaktadır.

Şekil 4.9. Perisinüzoidal alanlarda endostatinin kuvvetli boyaması

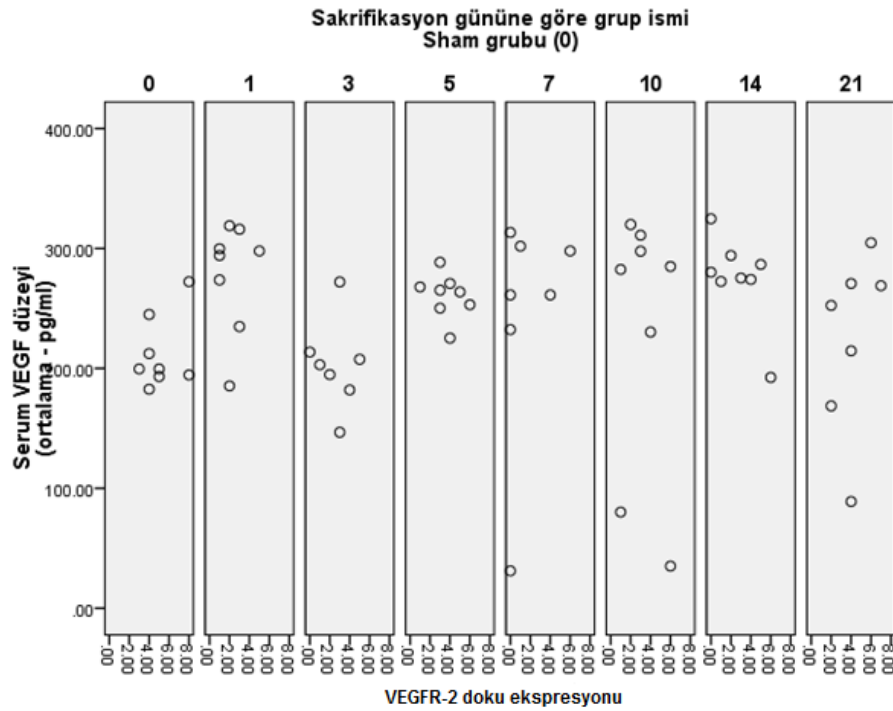
4.4. Anjiogenezin Sistemik Korelasyonu

Anjiogenezin doku ve kan belirteçleri arasında korelasyon olup olmadığına bakılmıştır.

VEGF serum düzeyi ile VEGFR-2 doku ekspresyonu grafik olarak değerlendirildiğinde aralarında beklenen ters ilişkili korelasyon gösterilmiştir (**Şekil 4.10. – 4.11.**). Ancak Spearman analizi yapıldığında gruptaki denek sayısı yetersiz olduğundan istatistiksel olarak anlamlı bağlantı kurulamamıştır (**Tablo 4.6.**).



Şekil 4.10. VEGF ile VEGFR-2 arasındaki korelasyon grafiği



Şekil 4.11. Gruplara göre VEGF – VEGFR-2 dağılımının genel eğilimi

Tablo 4.6. VEGF ile VEGFR-2 arasındaki istatistiksel korelasyon

| | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
| VEGF serum (ortalama)* | 212.39 | 277.61 | 202.84 | 260.60 | 242.73 | 230.23 | 275.05 | 230.36 |
| VEGFR-2 doku (ortalama)** | 5.13 | 2.25 | 2.57 | 3.63 | 1.57 | 3.25 | 2.63 | 4.14 |
| Korelasyon katsayısı (ρ) | 0.068 | 0.074 | -0.22 | -0.37 | 0.31 | -0.18 | -0.49 | 0.52 |
| P-değeri | 0.87 | 0.86 | 0.64 | 0.37 | 0.50 | 0.67 | 0.22 | 0.23 |

*Birim – ng/ml

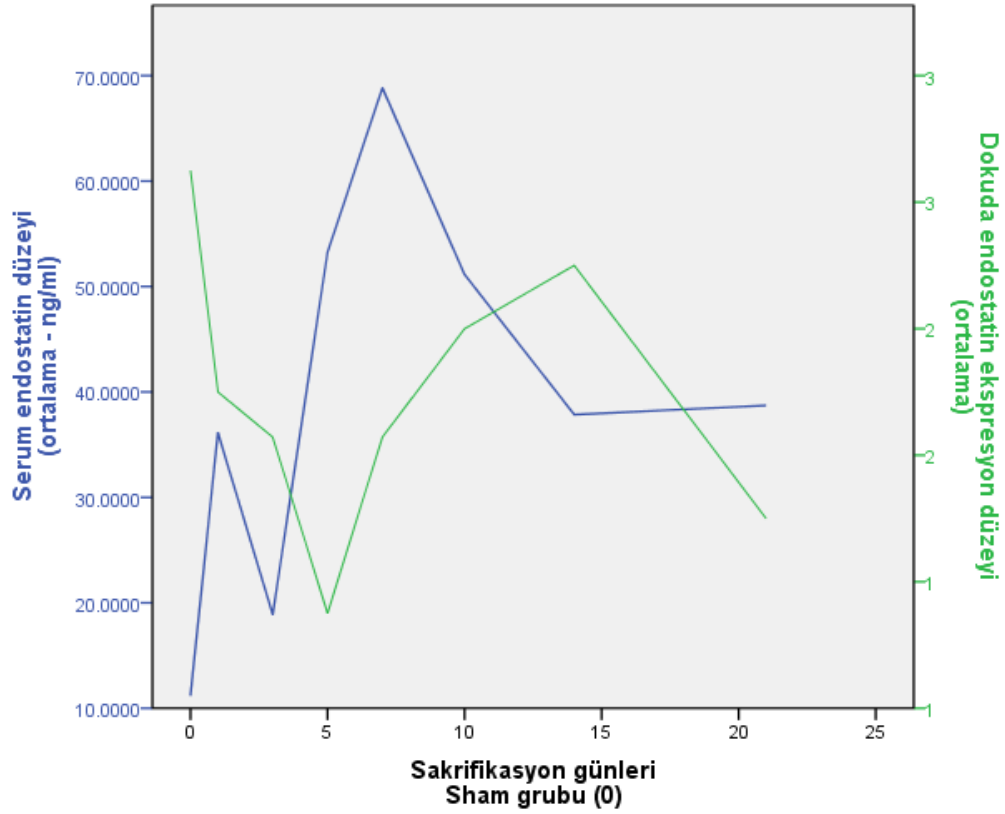
**Ordinal değişken

4.5. Antianjiogenezin Sistemik Korelasyonu

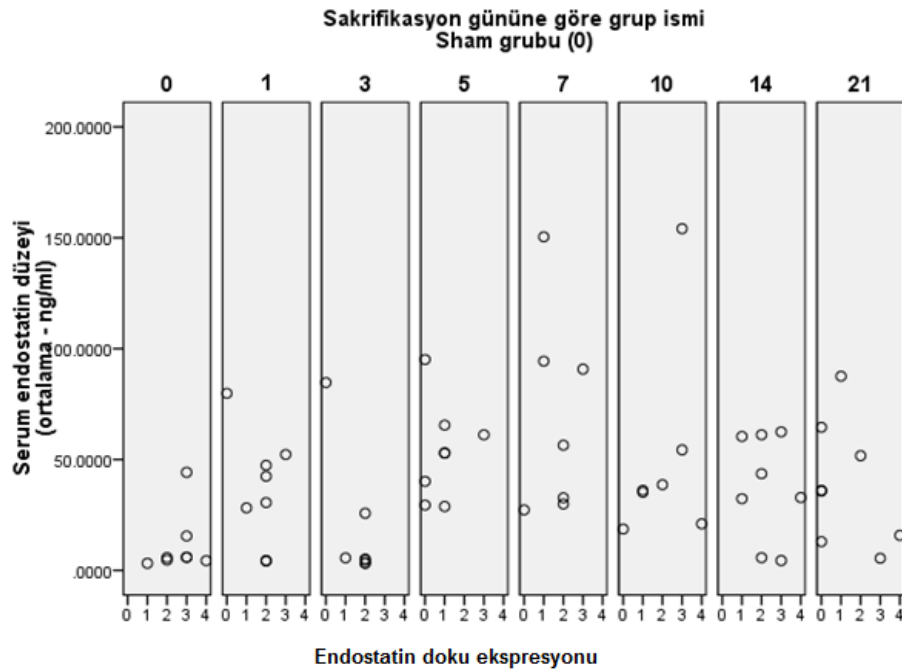
Doku ve kan endostatin düzeyleri arasındaki korelasyon grafik olarak değerlendirildiğinde 0. günde paralel olup 1. ile 7. günler arasında paralel izlemektedir (pozitif korelasyon). Ancak 10. günde yine antiparalel olup 21. güne kadar ters orantılı seyretmektedir. Doku endostatini 5. günden 14. güne kadar dokuda

birikim göstermiş ve kandaki endostatin eğrisi ile paralel seyretmemektedir (Şekil 4.12. – 4.13.).

Yapılan Spearman korelasyon testi günler arasında sadece 0., 3. ve 10. günlerde orta ve şiddetli korelasyon (ρ) gösterip hiçbir istatistiksel anlamlılık (P) ortaya koyamamıştır (Tablo 4.7.).



Şekil 4.12. Serum-doku endostatinin gruplara göre grafik dağılımı



Şekil 4.13. Kan ve doku endostatin arasındaki korelasyon

Tablo 4.7. Kan ve doku endostatin arasındaki istatistiksel korelasyon

| | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|--|-------|--------|--------|--------|-------|---------|---------|---------|
| Endostatin serum düzeyi (ortalama)* | 11.18 | 36.15 | 18.90 | 53.24 | 68.83 | 63.24 | 37.85 | 38.72 |
| Endostatin doku ekspresyonu (ortalama)** | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| Korelasyon katsayısı (ρ) | 0.40 | -0.055 | -0.67 | 0.14 | 0.06 | 0.44 | -0.05 | -0.25 |
| P-değeri | 0.33 | 0.90 | 0.10 | 0.74 | 0.91 | 0.33 | 0.91 | 0.54 |

*Birim – pg/ml

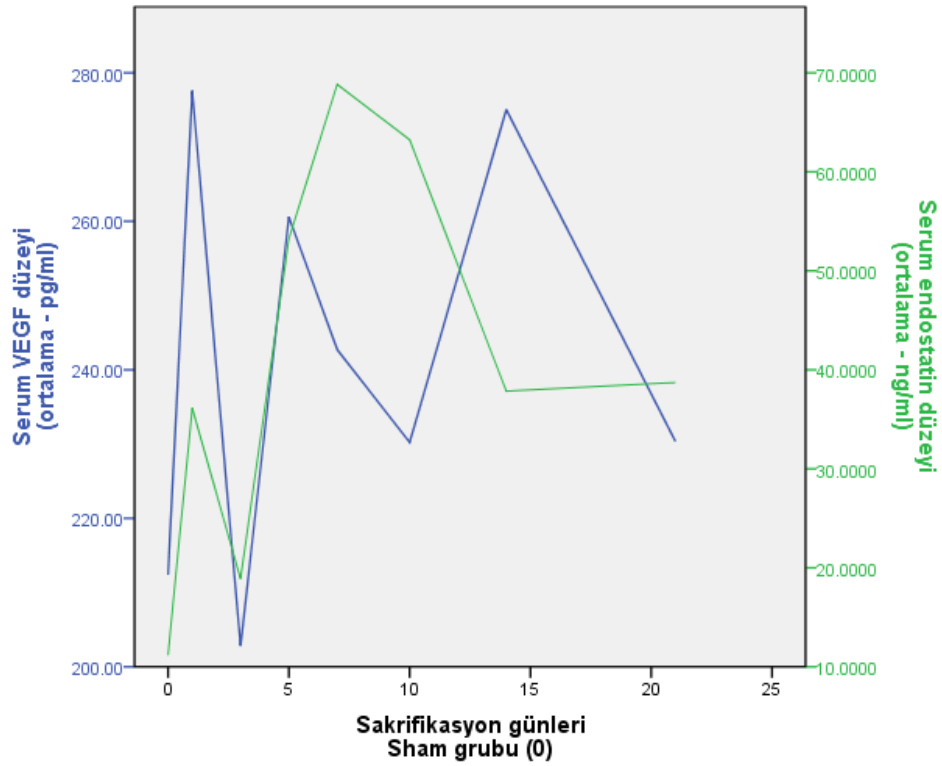
**Ordinal değişken

4.6. VEGF-Endostatin Korelasyonu

Kandaki VEGF ile endostatinin gruplara göre dağılımı ve aralarındaki korelasyonun kalibrasyon grafiği oluşturması açısından daha değerli bir katkı sağlayabileceğinden deneklere gruplarına göre Spearman korelasyon testi uygulanmıştır (Tablo 4.8.).

Bütün gruplarda korelasyon katsayısı orta-yüksek düzeyde olup istatistiksel olarak farklar sham, 3., 5 ve 10. gün grupları dışında anlamlı hesaplanmıştır.

Grafik korelasyona bakıldığında 5. güne kadar eğriler paralel gelişim gösterip 5. günden sonra antiparalel izlemeye devam etmektedir (**Şekil 4.14.**). Ayrıca 5. günde eğriler çaprazlaşıp VEGF düzeyi 10. güne kadar düşmeye devam ederken endostatin düzeyi yükselip VEGF eğrisi ile ters eğilime geçmektedir. Ve nihayetinde VEGF 21. günde bazal seviyeye ulaşmaya çalıştığı halde endostatin yüksekliğinin devam ettiği gözlenmektedir.



Şekil 4.14. Kandaki VEGF ile endostatin grafik korelasyonu

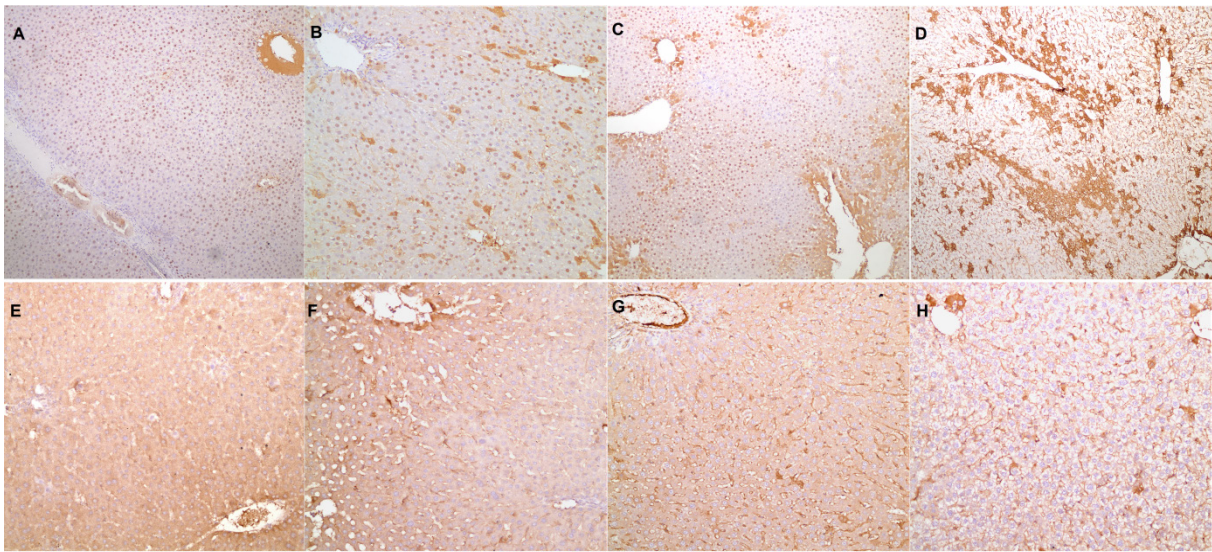
Tablo 4.8. Kan VEGF ile endostatin düzeyleri arasındaki istatistiksel korelasyon

| | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|------------------------------------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|---------|-----------|
| VEGF serum düzeyi (ortalama) | 212.39 | 277.61 | 202.84 | 260.60 | 242.73 | 230.23 | 275.05 | 230.36 |
| Endostatin serum düzeyi (ortalama) | 11.18 | 36.15 | 18.90 | 53.24 | 68.83 | 63.24 | 37.85 | 38.72 |
| Korelasyon katsayısı (ρ) | 0.24* | -0.69** | -0.36* | 0.43* | -0.85** | -0.62** | -0.83** | -0.98** |
| P-değeri | 0.57 | 0.06 | 0.43 | 0.29 | 0.02*** | 0.10 | 0.01*** | <0.001*** |

*Düşük korelasyon katsayısı

**Orta-yüksek korelasyon katsayısı

***İstatistiksel anlamlı



VEGFR-2 sıfır (A), düşük (B), orta (C) ve yüksek (D) ekspresyonu.

Endostatin düşük (A), orta (B), yüksek (C) ve çok yüksek (D) ekspresyonu

Şekil 4.15. VEGFR-2 (üst sıra) ve endostatin (alt sıra) doku ekspresyonu

4.7. VEGF-Endostatin Oranı

Endostatin değerleri (nanogram/ml) VEGF değerlerine (pikogram/ml) 1000 kat fark oluşturduğundan VEGF-endostatin oranının edinme yolu VEGF değerinin

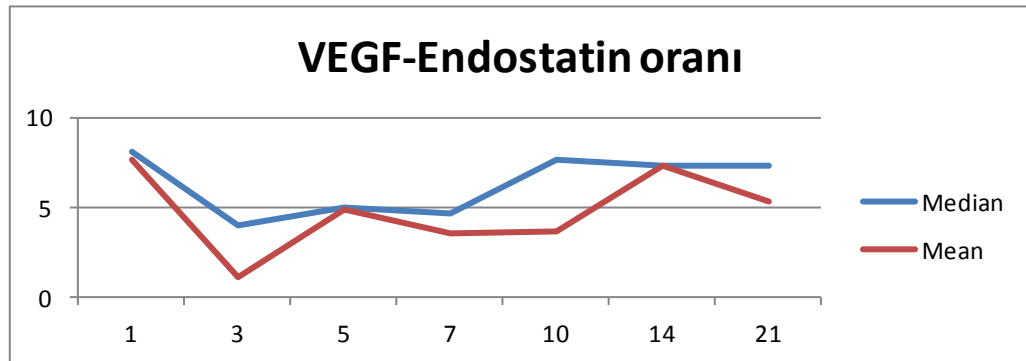
endostatin değeri ile bölünmesi sonucu elde edilmiştir. Oran değerleri birimsiz bir parametre olup sadece bir oran göstergesidir (pg/ml//ng/ml) (**Tablo 4.9.**).

Tablo 4.9. Gruplar için hesaplanan VEGF-Endostatin oranlar

| Günler | Sham | 1. gün | 3. gün | 5. gün | 7.gün | 10. gün | 14. gün | 21. gün |
|--|-------|--------|--------|--------|-------|---------|---------|---------|
| VEGF/Endostatin oranı (ortalama üzerinden)** | 19.00 | 7,68 | 1,07 | 4,89 | 3,53 | 3,64 | 7,27 | 5,35 |
| VEGF/Endostatin oranı (ortanca üzerinden)** | 34,30 | 8.11 | 3.96 | 5.00 | 4.63 | 7.59 | 7.27 | 7.25 |

**birim (pg/ml)/(ng/ml) olarak hesaplandı. Hesapta kullanılan değerler her iki parametreye ait ortalama ile ortanca değerleri idi

Görüldüğü üzere 1. (7.68 ile 8.11), 5. (4.89 ile 5.00) ve 14. (7.27 ile 7.27) günde ortalama ve ortanca üzerinden hesaplanan VEGF-endostatin oranı değerleri birbirine yakın izlenmiştir. Serum VEGF ve endostatinin deney gruplarına ait kalibrasyon grafiği **Şekil 4.16'da** sunulmuştur.



Şekil 4.16. VEGF ile endostatin ortalama ve ortanca değerlerini kullanarak oluşturulan VEO eğrileri (mavi – ortanca, kırmızı - ortalama)

Grafikte ortalama ile ortanca üzerinden oluşturulan oran eğrileri nispeten aynı eğilimi gösterdiğini görebilmekteyiz (**Şekil 4.16.**).

5. TARTIŞMA

Kısmi karaciğer rezeksiyonu modeli kemirgenlerde ve özellikle sıçanlarda iyi çalışılmış bir modeldir. Sıçanlarda %70 hepatektomi sonrası 24-48. saatler arasında hepatoselüler proliferasyonun zirve değerlerine ulaşp 10. günde ise bazal değerlere indiği bilinmektedir. 14. güne kadar da mevcut karaciğer fonksiyonel kitlesini geri kazanıp preoperatif hacme ulaşmaktadır [32, 54, 67, 101]. Rejenerasyon bu bahsedilen çalışmalardaki gibi bizim çalışmamızda da benzer özellikler göstermiştir **(Tablo 4.1., Şekil 4.1.)**.

Anjiogenezin amacı hipoksik dokulara oksijen ve besin sağlayacak olan mikrodamar ağını oluşturmaktır. Memeli hayvanlarda hücrelere yeterli besin ve oksijenin sağlanabilmesi için, damarların bu hücrelerden buldukları uzaklık en fazla 200 µm olarak bildirilmektedir [37]. Karaciğer rejenerasyonu sırasında ortaya çıkan anjiogenez sürecinde hepatositlerin rejenerasyon adacıları oluşturup hipoksiye yanıt olarak VEGF salgıladıkları gösterilmiştir [15, 24, 27, 109]. Anjiogenezi inhibe ve regüle eden etkenlerin de ekspresyonu 72. saatten sonra artmaya başlar [24, 32, 54, 67].

Doğrul ve ark'nın çalışmasında vasküler endotelial büyüme faktörü kısmi hepatektomi sonrası karaciğerde 3. ile 5. günler arasında en yüksek değerlere ulaşp 10. günde bazale döndüğü gösterilmiştir [54].

Anjiogenezin regülasyonunu sağlayan etkenler arasında çok geniş etkilere sahip ve transkriptomun çeşitli seviyelerinde etkisini gösteren faktörler de tanımlanmıştır [19-21]. Sasaki ve arkadaşlarının çalışmasında bunlardan en güçlü antianjiogenik etkilere sahip olan endostatin damarların bazal membranını oluşturan kolajen-15 (endostatin 15 olarak tanımlanmıştır, ya da restin) ve ayrıca karaciğerde sürekli üretilen kolajen-18 moleküllerinin proteolitik degradasyonu sonucu oluştuğu gösterilmiştir [87]. Bu faktör oluşumunu anjiogenez sırasında dominant olan MMP-bağımlı enzimatik sistemlere borçlu olup hem karaciğerdeki üretimi sırasında oluşan matriksteki depodan boşalabildiği gösterilmiş hem de anjiogenez süreci sırasında perivasküler alanlardan sistemik dolaşıma katılabildiği de ortaya konulmuştur [19, 26, 54, 87, 110]. Karaciğerde hipoksi sonucu oluşan VEGF ligandının lokal etkisi nedeniyle meydana gelen endotelial göçü ve matriksin proteolitik degradasyonu

süresince üretilen yıkım ürünleri dolaşıma katılarak endokrin etkilerini gösterebilmektedir. Ayrıca, VEGF molekülünün dolaşıma katılıp sistemik etkisinin inhibisyonu da bahsedilen yıkım ürünleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu konuda, anabilim dalımızda Doğrul ve ark. tarafından yapılan bir antianjiogenez sıçan modeli çalışmasında karaciğer dokusundaki endostatin prekürsörü olan kolajen-18'in mRNA'sına bakıldığında antianjiogenez yanıtının 5. günde ortaya çıkıp 10. gününde zirveye ulaştığı 14. gününde de bazale indiği gösterilmiştir [54]. Anabilim dalımızda Çolakoğlu ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise serum endostatin düzeyleri 14. günde ilk güne göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermektedir [101]. Böylece bu negatif geri bildirim sistemi sayesinde anjiogenezin sistemik düzeyde olumsuz ve gereksiz etkileri endostatin tarafından nötralize edilmektedir [19, 21, 24, 44, 111].

Doğrul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmadaki [54] VEGF doku ekspresyonu bizim çalışmamızda gösterilen VEGFR-2 ekspresyonuna göre farklı dağılım göstermiştir (**Tablo 4.3.**, **Şekil 4.5. – 4.6.**). Doku VEGFR-2 bazal ekspresyon değerleri yüksek olup bunun büyük çoğunluğu stimüle edilmemiş endotelyositler üzerindeki ekspresyonu ile sağlanmaktadır. Dolayısıyla, VEGFR-2 ekspresyonu yüksek beklenen sham grubuna göre karşılaştırma yapıldığında 1. günden başlayıp 5. güne kadar artan doku VEGFR-2 ekspresyonu 7. günde anlamlı bir düşüş göstermesi doğaldır. Onuncu, 14. ve nihayetinde 21. günde bazale dönme eğilimi görülmektedir. Sham grubuna ait yüksek bazal değer (**Şekil 4.5.**) 1. günde düşüşünün kandaki artmış VEGF düzeyi ile ters orantılı oluşu spesifik bağlamanın işaretidir. Sonraki günlerde ise anjiogenezin artması ile paralel olarak VEGFR-2 ekspresyon eden hücre oranı (endotelyosit proliferasyonu artışı ve VEGFR-2 ekspresyonu artışına ikincil) artmaktadır (**Tablo 4.3.**). Yedinci güne ait belirgin düşüş (ortalaması 1.57, ortancası 0.0) ise VEGFR-2'inin bağlama merkezlerinin tamamının VEGF tarafından kapatılmış ve VEGFR-2/VEGF kompleksinin konformasyonunda antikora cevap vermeyecek değişiklik ile birlikte anjiogenezin inhibe olmasına bağlı olabilir (**Şekil 4.10.**). Onuncu günden itibaren anjiogenez süreci inhibisyonu gerçekleştiğinden VEGFR-2 ekspresyonunun bazale dönmesi ise beklenen bir sonuçtur. Aynı anda VEGF reseptöründen kurtulan VEGF ligandı yeni oluşmuş damar ağı sayesinde sistemik dolaşıma katılması kolay olacağından sistemik

VEGF konsantrasyonu artış göstermesi göze çarpmaktadır. On dördüncü günde sistemik VEGF lokal pik yapıp 21. güne doğru düşüş göstermekte olup muhtemelen metabolize olup bazale dönme eğilimi oluşturmaktadır (**Şekil 4.10**).

Antianjiogenez süreci dokudaki endostatin depolarının boşalıp tekrar birikmesi ile ilişkilidir [26]. Doku endostatininin bazal değeri yüksek olduğundan (**Tablo 4.5.**) deney gruplarına ait endostatin ekspresyonu matriksteki depodan yıkanma ve hepatositlerden kolajen-18 olarak eksprese edilip proteolitik olarak de novo oluşma dengesini yansıtmaktadır. Dokudaki ekspresyonu sham grubunda yüksek iken 1. günden itibaren 5. güne kadar tedrici düşüş göstermektedir. Bu döneme denk gelen serum endostatin düzeyleri sham grubunda düşük iken 1. günde muhtemelen cerrahi travmaya ikincil minör zirve yapıp 3. günde neredeyse bazale dönmektedir (**Tablo 4.5.**). Yedinci günde ise major zirve yapıp dokudaki endostatinin artışa geçmesi ile orantılı izlenmektedir. Bu noktadan sonra dokudaki endostatin 14. güne kadar hep artarken serum endostatinini 14. günde plato yapıp sabit kalmaktadır.

Bu analiz yapıldığında serum endostatin değerlerine göre doku endostatin ekspresyonu rakamsal olarak çok farklı alanlarda dağılım gösterdiğinden (serum ile doku ekspresyon değerleri arasında 10-15 kat fark mevcuttur) grafik yöntemler istatistiksel yöntemlere tercih edilmiştir.

Doku endostatin prekürsörü olan kolajen-18'in mRNA'sının ekspresyonunda Doğrul ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre ilk günden itibaren tedrici artış gözlenmekle birlikte 14. günde zirveye ulaşmaktadır [54]. Bizim çalışmamızda doku endostatinini karaciğer ekstraselüler matriksinde depolanmış halde olduğundan endostatinin parakrin ve endokrin fonksiyonlarını karşılamak üzere gereken miktar bu mevcut depolardan sağlanmaktadır. Ayrıca, anjiogenez süresince endostatin miktarı Doğrul ve ark.'na göre [54] gittikçe artan kolajen-18 ekspresyonu ile birlikte anjiogenezin tedrici stimülasyonuna bağlı olarak ve yine ESM'nin tedrici olarak artan proteolitik yıkımı sayesinde dolaşan endostatin miktarında artış gözlenmektedir (**Tablo 4.7., Şekil 4.12.**). Birinci gündeki sistemik endostatin artışının travmaya sekonder karaciğerden dolaşıma geçmesi sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Üçüncü günde her ikisi de (doku/sistemik) düşme eğilimini gösterip sistemik endostatin

düzeyi 3. ile 7. gün arasında zirveye çıkmaktadır. Dokudaki endostatin ekspresyonu ise 5. günden itibaren uyarılan de novo sentezi sonucu 14. güne kadar istikrarlı artış göstermektedir. Ancak 14. günden sonra bazale dönmesi beklenen sistemik endostatin serum düzeyi 21. günde lokal minimuma ulaşmış muhtemelen endokrin fonksiyonunu yerine getirmek üzere aynı seviyede kalmaktadır. Elde edilen bu bulguların grafik olarak değerlendirilmesi sonucu endostatin sistemik konsantrasyonu ile endostatin doku üretimi arasında paralel olan direkt ilişki mevcut olduğunu görebilmekteyiz (**Şekil 4.12**).

Bütün bu bulgularla VEGF ile VEGFR-2 arasındaki reseptör-ligand kinetiği beklenen bir sonuç vermekle birlikte patolojik anjiogenez sürecinde anjiogenezin regülasyonu bozuk olacağından ve tabii ki VEGF/VEGFR oranında değişkenlerden biri ordinal olduğundan sözü geçen oranın duyarlı olmayacağı düşüncesine varılmıştır. Anjiogenezin başlattığı ve geri bildirim sistemi üzerinden regüle ettiği anti-anjiogenez sürecinin sunduğu endostatin doku-serum konsantrasyonu oranının da aynı nedenlerle geçerli olmayacağına inanıyoruz. Dolayısıyla VEGF-endostatin oranının patolojik anjiogenez durumunda tanı koydurucu olabileceğini düşünmekteyiz. Bu iki parametre hepatektomi sonrası oluşan lokal karaciğer yanıtı (parakrin) dışında endokrin anlam da taşımaktadır [11, 44]. Çalışmamızda her iki molekül grafik olarak değerlendirildiğinde çizdikleri dağılım patternlerinin 0. ile 5. günler arasında pozitif korelasyon gösterdiği gözle çarpmaktadır. Spearman testi ile değerlendirildiğinde 0., 3., 5. ve 10. günlerde istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır ($P > 0.10$). Saitou ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hepatektomi geçirmiş insan deneklerinde VEGF serum düzeyinin 6 saatte 2 kat arttığı gösterilmiştir [112]. Reynaert ve ark. karaciğer rejenerasyonu sıçan modelinde serum VEGF düzeyinin 72. ile 96. saatler arasında pik yaptığını göstermişlerdir [36]. Bizim çalışmamızda ise birinci gündeki her iki molekülün artışı aynı kinetiği göstermiş olup muhtemelen travmaya yanıt olarak değerlendirilebilir. Vasküler endotelial büyüme faktörünün üçüncü günden itibaren artışı hipoksiye maruz kalan hepatositler tarafından salgılanmasına bağlıdır. Bunun sonucu olarak anjiogenezin başlattığı kolajen-18'in proteolitik yıkımı sayesinde endostatinin perivasküler alandan dolaşıma salınması tetiklenmektedir. Bu demektir ki anjiogenezin şiddeti arttıkça anti-anjiogenez de otomatik olarak artmaya başlayacaktır (negatif geri bildirim sistemine uygun olarak).

Beşinci gündeki iki parametrenin eğrilerinin çaprazlaşması anjiogenezdeki düşüş, anti-anjiogenezin ise antagonistik etkisini gerçekleştirmek üzere beklendiği gibi artışa geçmesi sonucu ortaya çıkmaktadır (**Şekil 4.14.**). Beşinci ile 21. gündeki gruplar arasında VEGF ile endostatin arasında ters orantılı antiparalel kinetik saptanmıştır. Sonuç olarak endostatinin sistemik konsantrasyonlarının artması VEGF molekülünün olası endokrin etkisini de azaltabileceği tahmin edilmektedir. Onuncu günde karaciğerdeki neovaskülarizasyon sayesinde lokal iskemi azaldığından VEGF üretimi azalıp bazal sistemik değerlere dönmektedir (21. gün). Onun tersine endostatinin ise 21. günde de bazale dönmediği saptanmıştır. Bu durumun endostatinin karaciğer dokusundan vasküler alana hala devam eden fazla salınımına ya da başka bilinmeyen mekanizmalara bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü-Endostatin oranı (VEO) eğrisi deneysel modelde oluşturulup matematiksel fonksiyonunun özelliklerini hesaplamak üzere daha fazla veri toplanmasını gerektirecektir. Çalışmamıza ait aynı deneysel model kullanıldığında daha az hayvan sayısı (deneyde oluşturulabilecek en homojen şartlar yaratılmak koşuluyla) postoperatif her gün kan alımı ile **Şekil 4.16.'da** gösterilen ortanca-ortalama eğrileri etrafında daha net ve yumuşak açılı (hayvan sayısı ve birey özellikleri homojenliği ile orantılı) VEO eğrisinin oluşması beklenmektedir. Birinci, 5. ve 14. günlere ait noktalarda ortalama ve ortanca eğrileri çok yakın olup matematiksel fonksiyonun bulunabileceği alanı kısıtlamaktadır. Patolojik anjiogenez sırasında artacak olan VEGF-endostatin oranının, VEGF artışı veya endostatin azalışı sonucunda ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz. Bu oranın her türlü hasta profilinde VEGF düzeyinin endostatin düzeyi üzerinden standartize edildiğinden değerli katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

İleri klinik çalışmalarda insan deneklerinde karaciğer rezeksiyonu sonrası takiplerinde insana uygun VEO eğrisi oluşturulması ve dolayısıyla karaciğer hasar ve rejenerasyon düzeyini tahmin ettirebilecek analitik ve az invazif metodun geliştirilebilmesi öngörülmektedir.

Schips ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada RCC hastalarında sağlıklı bireylere göre VEGF düzeylerinin anlamlı yüksek olduğunu saptarken endostatin düzeylerinin anlamlı fark gösterememişlerdir. Bu bahsedilen etkenlerin sağkalıma

etkisini de gösterememişlerdir [43]. Ancak bahsedilen hasta popülasyonu histopatolojik, demografik açıdan heterojen bir grup olduğu için bu çalışmaya ait bilgi standartizasyon için kullanılamaz. Ayrıca bu çalışmada VEGF-endostatin düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı korelasyon bulunamamıştır. Buna karşın, Teh ve arkadaşlarının çalışmasında bir meme karsinomu popülasyonunda serum endostatin düzeylerinin yüksek olduğu grupta düşük olanlara göre intratümöral mikrodamar yoğunlukları istatistiksel anlamlı bir şekilde azalmış olarak gösterilmiştir [44]. Bir başka çalışmada Zhang ve ark., akciğer karsinomu şüphesi bulunan hastalarda plevral efüzyon sıvısı ve kan serumundaki VEGF ile endostatin düzeylerini değerlendirip bu etkenlerin histolojik olarak malign ve benign olarak gösterilen hastalarda efüzyon sıvısı ile serum seviyeleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulmuşlardır [42]. Ancak VEGF ile endostatin arasındaki bağlantı prediktif güç açısından değerlendirilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise sıçan modelinde bu iki değer arasında anjiogenezin farklı histopatolojik aşamalarında (7.,14. ve 21. gün grupları) istatistiksel anlamlı korelasyon bulunduğundan dolayı bahsedilen oran (VEO) Zhang ve ark.'nın çalışmasında kullanılmış olsa idi daha yüksek prediktif değer sağlanabilirdi.

Patolojik durumlar süresince takip amaçlı VEO'nun kullanımı ile birlikte bu oranın sağlıklı bireylerde anjiogenez-antianjiogenez dengesinin değişikliklerinin taranması için kullanılabileceği de tahmin edilmektedir. Dolayısıyla, her iki değer (VEGF/endostatin) farklı yönde çalışan sistemlere ait olup sağlıklı bireyin anjiogenez sürecinin fizyolojik sınırları dışına çıkıp çıkmadığı gösterilebileceği düşünülmektedir. Bu yorumlar birleştirildiğinde VEGF-endostatin oranının sağlıklı bireylerde belirli standartizasyon çalışmaları sonrası bir tarama testi olarak kullanılabileceği tahmin edilmektedir.

6. SONUÇ

Sıçanlarda kısmi karaciğer rezeksiyonu (%70) sonrası oluşan antianjiogenez ile anjiogenez arasındaki ilişkiler ve her iki sürecin sistemik etkisi ve orantısını göstermek amacıyla planlanan bu çalışmada:

1. Rejenerasyon süreci daha önce yapılan çalışmalarla benzerlik göstererek 1. günde pik (%57.21) yapıp 5. günden itibaren bazale dönme eğilimine geçmiştir.
2. Sistemik anjiogenez değerleri ilk kez 1. günde yükselip (277.61 pg/ml), 2. zirveyi 5. günde oluşturmaktadır (260.60 pg/ml). On dördüncü günde 3. zirve (277.05 pg/ml) oluşup 21. günde VEGF düzeyi bazale dönme eğilimine geçmektedir. Bütün bahsedilen değerler arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olup (P değerleri > 0.21) veri üzerinden yorum yapılabilmesi için grafik yöntemle değerlendirilmiştir.

Doku anjiogenezi bazal değeri yüksek olduğundan gözlemlenen anlamlılık oranları tersten yorumlanmıştır. Beşinci günde zirve yapan VEGFR-2 ekspresyonu bazale (ortalama = 3.63) yaklaştığından istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir (P = 0.13). Yedinci günde reseptör ekspresyonu en düşük düzeye (ortalama = 1.57) ulaşip istatistiksel anlamlı fark (P = 0.02) tespit edilebilmektedir.

Sistemik VEGF-VEGFR-2 oranı istatistiksel yöntemle anlamlı korelasyon göstermemekle birlikte grafik yöntemle sistemik VEGF düzeyi ile dokudaki VEGF reseptörü arasında ilişki ortaya konulmuştur.

3. Sistemik antianjiogenez değerleri ilk kez 5. günde 53.24 ng/ml değerine ulaşip istatistiksel anlamlı fark sergilemektedir (P = 0.07). Yedinci günde zirve yapıp (68.83 ng/ml) hala anlamlı fark göstermektedir (P = 0.008). On dördüncü günde ise 37.85 ng/ml düzeyine kadar düşüp istatistiksel olarak anlamlı (P = 0.43) azalma eğilimine geçmekle birlikte bazale dönmemektedir. Doku endostatini matrikstekide de novo oluşum ve perivasküler alandan salınımına bağlı absöüt ve rölatif düzey değişimleriyle ilişkilidir. İlk istatistiksel olarak anlamlı (P = 0.04) düşüş (ortalama = 2) 3. günde ortaya çıkıp 5. günde en düşük değere (ortalama = 1) ulaşmaktadır (P = 0.007). Yedinci günden itibaren anlamlı fark ortadan kaybolup 14. günde en yüksek değere (ortalama = 2, IQR = 2-3, P =

0.44) ulaşıp 21. günde de bazale göre düşük ekspresyon sergilemektedir (ortalama = 1, IQR = 1-3, P = 0.08). Sistemik endostatin ile doku endostatin arasındaki bağlantı istatistiksel yöntemle anlamlı korelasyon göstermesi korelasyonun grafik olarak değerlendirilmesini kolaylaştırmaktadır.

Sistemik VEGF ile sistemik endostatin arasındaki oran (VEO) ortalama ile ortanca değerleri kullanılarak hesaplandığında keskin açılı lineer olmayan 2 ayrı eğri oluşturuldu. Birinci, 5. ve 14. günde ortalama ve ortanca bazlı eğriler kesişip aralarında kapalı alan oluşturmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda günlere ait denek sayısının artırılması, ortalama ve ortanca eğrilerinin birleşmesi için istatistiksel yeterli şart sağlayabileceği düşünülmektedir. Nihayetinde, bu oranın anjiogenezin baskın olduğu çeşitli patolojik süreçlerde bir analitik ve prediktif yöntem oluşturabilmesi için ileri klinik çalışmaların gerekli olduğu düşünülmektedir.

Vargı

Bu çalışmada karaciğer rejenerasyonu sırasında anjiyojenez ve antianjiyojenez süreçlerinin doku ve sistemik belirteçlerinin korelasyonu ortaya konmuştur. Sistemik VEGF dokuda hipoksi düzeyinin belirteci olup sistemik düzeyi dokuda endotelyositler tarafından dışavurulan VEGFR-2'ye bağlandığından karmaşık ve doğrusal olmayan kinetik göstermektedir. Sistemik endostatin ise dokudaki üretimine beklenen uyum gösterip karaciğer hücre dışı matriksindeki Kollajen 18'in dışavurumunu ve anjiyojenez sırasındaki proteolitik etkinliği yansıtmaktadır.

Dolayısıyla, sistemik VEGF düzeyi karaciğerdeki hipoksiye bağımlı anjiyojenezi gösterirken sistemik endostatin karaciğerdeki proteolizise bağımlı matriks degradasyonunu belirtmektedir. Bu iki parametre aynı sürecin farklı noktalarını yansıttığı için VEGF-endostatin oranı olarak tarafımızca tanımlanan değer anjiyojeneze bağımlı süreçleri optimal değerlendirebileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Seminars in Cancer Biology* 2003; **13**: 159-67.
2. Folkman J. Is angiogenesis an organizing principle in biology and medicine? *Journal of Pediatric Surgery* 2007; **42**: 1-11.
3. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology* 2001; **61**: 253-70.
4. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, Angiogenesis, and Growth Factors: Ephrins Enter the Fray at the Border. *Cell* 1998; **93**: 661-4.
5. Allen J, Bergsland EK. Angiogenesis in colorectal cancer: therapeutic implications and future directions. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2004; **18**: 1087-119.
6. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *European Journal of Internal Medicine* 2003; **14**: 459-69.
7. Fernández M, Semela D, Bruix J et al. Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology* 2009; **50**: 604-20.
8. Folkman J. Tumor Angiogenesis. In: George K, Sidney W, eds. *Advances in Cancer Research*: Academic Press 1985:175-203.
9. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Seminars in Oncology* 2001; **28**: 536-42.
10. Folkman J. Angiogenesis. In: Editors-in-Chief: Sydney B, Jeffrey HM, eds. *Encyclopedia of Genetics*. New York: Academic Press 2001:66-73.
11. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Seminars in Oncology* 2002; **29**: 15-8.
12. Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2004; **18**: 991-1006.
13. Keyhani A, Jendiroba DB, Freireich EJ. Angiogenesis and leukemia. *Leukemia Research* 2001; **25**: 639-45.
14. Zent R, Pozzi A. Angiogenesis in Diabetic Nephropathy. *Seminars in Nephrology* 2007; **27**: 161-71.
15. Parikh AA, Ellis LM. The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2004; **18**: 951-71.
16. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttua S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters* 2006; **580**: 2879-87.
17. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y et al. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *Journal of Hepatology* 2001; **34**: 683-9.
18. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *The Lancet Oncology* 2001; **2**: 667-73.
19. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C et al. Endostatin's Antiangiogenic Signaling Network. *Molecular Cell* 2004; **13**: 649-63.
20. Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. Endostatin: The logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resistance Updates* 2005; **8**: 59-74.
21. Benezra R, Rafii S. Endostatin's endpoints—Deciphering the endostatin antiangiogenic pathway. *Cancer Cell* 2004; **5**: 205-6.
22. Cattaneo MG, Pola S, Francescato P et al. Human endostatin-derived synthetic peptides possess potent antiangiogenic properties in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* 2003; **283**: 230-6.
23. Dhanabal M Fau - Ramchandran R, Ramchandran R Fau - Waterman MJ, Waterman Mj Fau - Lu H et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999 Apr 23; **274**: 11721-6.
24. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y et al. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 1997; **88**: 277-85.
25. Shichiri M Fau - Hirata Y, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB Journal* 2001 Apr; **15**: 1044-53.
26. Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2004; **1654**: 13-22.

27. Pahlavan PS, Feldmann Jr RE, Zavos C, Kountouras J. Prometheus' Challenge: Molecular, Cellular and Systemic Aspects of Liver Regeneration. *Journal of Surgical Research* 2006; **134**: 238-51.
28. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: Role of vascular endothelial growth factor. *Seminars in Oncology* 2002; **29**: 3-9.
29. Black D, Lyman S, Heider TR, Behrns KE. Molecular and cellular features of hepatic regeneration. *Journal of Surgical Research* 2004; **117**: 306-15.
30. Das SK, Vasudevan DM. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. *Life Sciences* 2007; **81**: 1555-64.
31. Drixler Ta Fau - Vogten MJ, Vogten Mj Fau - Ritchie ED, Ritchie Ed Fau - van Vroonhoven TJMV et al. Liver regeneration is an angiogenesis- associated phenomenon. *Ann Surg* 2002 Dec; **236**: 703-11.
32. Fausto N. Liver regeneration. *Journal of Hepatology* 2000; **32**, **Supplement 1**: 19-31.
33. Furchtgott LA, Chow CC, Periwal V. A Model of Liver Regeneration. *Biophysical Journal* 2009; **96**: 3926-35.
34. Kay MA, Fausto N. Liver regeneration: Prospects for therapy based on new technologies. *Molecular Medicine Today* 1997; **3**: 108-15.
35. Michalopoulos GK. Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011; **43**: 173-9.
36. Reynaert H Fau - Chavez M, Chavez M Fau - Geerts A, Geerts A. Vascular endothelial growth factor and liver regeneration. *J Hepatol* 2001 May; **34**: 759-61.
37. Uda Y, Hirano T, Son G et al. Angiogenesis is crucial for liver regeneration after partial hepatectomy. *Surgery* 2012 Aug 3.
38. Kam I Fau - Lynch S, Lynch S Fau - Svanas G, Svanas G Fau - Todo S et al. Evidence that host size determines liver size: studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* 1987 Mar-Apr; **7**: 362-6.
39. Nordin A. SD, Weimann R., Studer P., Candinas D., Stroka D.S. 355 Hypoxia inhibits liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of Hepatology* 2005; **42**, **Supplement 2**: 131.
40. Ronco MT, Francés D, de Luján Alvarez M et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide in rat liver regeneration. *Life Sciences* 2007; **81**: 750-5.
41. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences* 2003; **28**: 488-94.
42. Zhang Y, Yu L-K, Xia N. Evaluation of serum and pleural levels of endostatin and vascular epithelial growth factor in lung cancer patients with pleural effusion. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012; **5**: 239-42.
43. Schips L, Dalpiaz O, Lipsky K et al. Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endostatin in Renal Cell Carcinoma Patients Compared to a Control Group. *European Urology* 2007; **51**: 168-74.
44. Teh SH, Hill ADK, Lee AWS et al. Raised plasma endostatin levels correlate inversely with breast cancer angiogenesis. *Journal of Surgical Research* 2004; **116**: 165-71.
45. Mitsuma W, Kodama M, Hanawa H et al. Serum Endostatin in the Coronary Circulation of Patients With Coronary Heart Disease and Its Relation to Coronary Collateral Formation. *The American Journal of Cardiology* 2007; **99**: 494-8.
46. Dhar DK, Ono T, Yamanoi A et al. Serum endostatin predicts tumor vascularity in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002; **95**: 2188-95.
47. Michalopoulos GK. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy: Critical Analysis of Mechanistic Dilemmas. *The American Journal of Pathology* 2010; **176**: 2-13.
48. Mehendale HM, Apte U. 9.15 - Liver Regeneration and Tissue Repair. In: Editor-in-Chief: Charlene AM, ed. *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier 2010:339-67.
49. Jonge JD, Olthoff KM. Chapter 5 - Liver regeneration: Mechanisms and clinical relevance. *Blumgart's Surgery of the Liver, Pancreas and Biliary Tract (Fifth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders 2012:87-101.e6.
50. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K et al. Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2001; **49**: 121-30.

51. Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E et al. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 1993; **18**: 79-85.
52. Assy N, Spira G, Paizi M et al. Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *Journal of Hepatology* 1999; **30**: 911-5.
53. de Graaf W, Heger M, Spruijt O et al. Quantitative Assessment of Liver Function after Ischemia-Reperfusion Injury and Partial Hepatectomy in Rats. *Journal of Surgical Research* 2012; **172**: 85-94.
54. Dogrul AB, Colakoglu T, Kosemehmetoglu K et al. Antiangiogenic response after 70% hepatectomy and its relationship with hepatic regeneration and angiogenesis in rats. *Surgery* 2010; **147**: 288-94.
55. Kahn D, Hickman R, Terblanche J, von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs--the response to different resection sizes. *The Journal of surgical research* 1988; **45**: 176-80.
56. 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. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1985; **105**: 331-6.
57. Tolstanova G, Deng X, Khomenko T et al. Role of anti-angiogenic factor endostatin in the pathogenesis of experimental ulcerative colitis. *Life Sciences* 2011; **88**: 74-81.
58. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: Therapeutic implications. *Seminars in Oncology* 2002; **29**: 10-4.
59. Lietard J, Theret N, Rehn M et al. The promoter of the long variant of collagen XVIII, the precursor of endostatin, contains liver-specific regulatory elements. *Hepatology* 2000; **32**: 1377-85.
60. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2001; **33**: 357-69.
61. Clement B, Musso O, Lietard J, Theret N. Homeostatic control of angiogenesis: A newly identified function of the liver? *Hepatology* 1999; **29**: 621-3.
62. Homsy J, Daud AI. Spectrum of activity and mechanism of action of VEGF/PDGF inhibitors. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 2007; **14**: 285-94.
63. Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S et al. Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor in Nonparenchymal as Well as Parenchymal Cells in Rat Liver after Necrosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; **254**: 587-93.
64. LeCouter J, Moritz DR, Li B et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; **299**: 890-3.
65. Ogawa S, Oku A, Sawano A et al. 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**: 31273-82.
66. Cao Y. Angiogenesis: What can it offer for future medicine? *Experimental Cell Research* 2010; **316**: 1304-8.
67. 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**: S64-6.
68. Papastefanou VP, Bozas E, Mykoniatis MG et al. VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration. *Archives of toxicology* 2007; **81**: 729-41.
69. Hurskainen M, Ruggiero F, Hagg P et al. Recombinant human collagen XV regulates cell adhesion and migration. *J Biol Chem* 2010; **285**: 5258-65.
70. Sato T, El-Assal ON, Ono T et al. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001; **34**: 690-8.
71. Marx J. Cancer. Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. *Science* 2005; **308**: 1248-9.
72. McCarthy M. Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 2003; **361**: 1959.
73. Gorski Dh Fau - Beckett MA, Beckett Ma Fau - Jaskowiak NT, Jaskowiak Nt Fau - Calvin DP et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999 Jul 15; **59**: 3374-8.

74. Graepler F Fau - Verbeek B, Verbeek B Fau - Graeter T, Graeter T Fau - Smirnow I et al. Combined endostatin/sFlt-1 antiangiogenic gene therapy is highly effective in a rat model of HCC. *Hepatology* 2005 Apr; **41**: 879-86.
75. Musso O Fau - Rehn M, Rehn M Fau - Theret N, Theret N Fau - Turlin B 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 Jan 1; **61**: 45-9.
76. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2012; **1822**: 2-8.
77. Foda HD, Zucker S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today* 2001; **6**: 478-82.
78. Torzilli PA, Bourne JW, Cigler T, Vincent CT. A new paradigm for mechanobiological mechanisms in tumor metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2012 Oct; **22**: 385-95.
79. Sabrkhany S, Griffioen AW, oude Egbrink MGA. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2011; **1815**: 189-96.
80. Hayes AJ, Li LY, Lippman ME. Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *BMJ* 1999; **318**: 853-6.
81. Yoon SS, Eto H, Lin CM et al. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res* 1999; **59**: 6251-6.
82. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. *Experimental Cell Research* 2006; **312**: 594-607.
83. Crystal RG. The body as a manufacturer of endostatin. *Nat Biotechnol* 1999 Apr; **17**: 336-7.
84. Peeters CF, de Geus LF, Westphal JR 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**: 246-9.
85. Oh Sp Fau - Kamagata Y, Kamagata Y Fau - Muragaki Y, Muragaki Y Fau - Timmons S et al. 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 USA* 1994 May 10; **91**: 4229-33.
86. Sim Bk Fau - MacDonald NJ, MacDonald Nj Fau - Gubish ER, Gubish ER. Angiostatin and endostatin: endogenous inhibitors of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev* 2000; **19**: 181-90.
87. Sasaki T, Larsson H, Tisi D et al. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *Journal of Molecular Biology* 2000; **301**: 1179-90.
88. Wen W Fau - Moses MA, Moses Ma Fau - Wiederschain D, Wiederschain D Fau - Arbiser JL et al. The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res* 1999 Dec 15; **59**: 6052-6.
89. Felbor U Fau - Dreier L, Dreier L Fau - Bryant RA, Bryant Ra Fau - Ploegh HL et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J* 2000 Mar 15; **19**: 1187-94.
90. Ricard-Blum S Fau - Ruggiero F, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 2005 Sep; **53**: 430-42.
91. Jia JD, Bauer M, Sedlaczek N et al. Modulation of collagen XVIII/endostatin expression in lobular and biliary rat liver fibrogenesis. *J Hepatol* 2001; **35**: 386-91.
92. Sasaki T, Fukai N, Mann K et al. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1998; **17**: 4249-56.
93. Standker L, Schrader M, Kanse SM et al. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett* 1997; **420**: 129-33.
94. Saarela J, Ylikärppä R, Rehn M et al. Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts. *Matrix Biology* 1998; **16**: 319-28.
95. Musso O, Theret N, Heljasvaara R 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**: 868-76.
96. Saarela J Fau - Rehn M, Rehn M Fau - Oikarinen A, Oikarinen A Fau - Autio-Harmainen H et al. 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 Aug; **153**: 611-26.
97. Halfter W Fau - Dong S, Dong S Fau - Schurer B, Schurer B Fau - Cole GJ, Cole GJ. Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 1998 Sep 25; **273**: 25404-12.
 98. Musso O Fau - Rehn M, Rehn M Fau - Saarela J, Saarela J Fau - Theret N 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 Jul; **28**: 98-107.
 99. Guenther U Fau - Herbst H, Herbst H Fau - Bauer M, Bauer M Fau - Isbert C et al. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. *Br J Cancer* 2001 Nov 16; **85**: 1540-5.
 100. Schuppan D Fau - Cramer T, Cramer T Fau - Bauer M, Bauer M Fau - Strefeld T et al. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. *Lancet* 1998 Sep 12; **352**: 879-80.
 101. Colakoglu T, Nursal TZ, Ezer A et al. Effects of Different Doses of Statins on Liver Regeneration Through Angiogenesis and Possible Relation Between These Effects and Acute Phase Responses. *Transplantation Proceedings* 2010; **42**: 3823-7.
 102. Whitworth A. Endostatin: are we waiting for Godot? *J Natl Cancer Inst* 2006 Jun 4; **98**: 731-3.
 103. te Velde Ea Fau - Reijkerker A, Reijkerker A Fau - Brandsma D, Brandsma D Fau - Vogten JM 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 Feb 28; **92**: 729-35.
 104. Tjin Tham Sjin Rm Fau - Satchi-Fainaro R, Satchi-Fainaro R Fau - Birsner AE, Birsner Ae Fau - Ramanujam VMS et al. 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 May 1; **65**: 3656-63.
 105. Kim Ym Fau - Jang JW, Jang Jw Fau - Lee OH, Lee Oh Fau - Yeon J et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2000 Oct 1; **60**: 5410-3.
 106. Poon Rt Fau - Ho JWY, Ho Jw Fau - Tong CSW, Tong Cs Fau - Lau C et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2004 Oct; **91**: 1354-60.
 107. Hu Th Fau - Huang C-C, Huang Cc Fau - Wu C-L, Wu Cl Fau - Lin P-R et al. Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005 May; **18**(5):663-72 2005 May; **18**: 663-72.
 108. Higgins GM AR. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Patol* 1931; **12**: 186-202.
 109. Rahimi N. Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. *Experimental Eye Research* 2006; **83**: 1005-16.
 110. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 2010; **141**: 52-67.
 111. Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin Signaling and Regulation of Endothelial Cell-Matrix Interactions. In: George FVW, George K, eds. *Advances in Cancer Research*: Academic Press 2005:197-229.
 112. Saitou Y, Shiraki K, Yamaguchi Y et al. Serum vascular endothelial growth factor-receptor 1 during liver regeneration. *Journal of Hepatology* 2004; **41**: 170-1.