

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RADYASYONUN İYONİZAN, OKSİDATİF VE REDÜKTİF
ETKİLERİNDE FAKTÖR ANALİZİ**

Dr. Caner AKTAŞ

**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ANKARA

2011

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**RADYASYONUN İYONİZAN, OKSİDATİF VE REDÜKTİF
ETKİLERİNDE FAKTÖR ANALİZİ**

Dr. Caner AKTAŞ

**RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Cengiz KURTMAN

ANKARA

2011

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Radyasyonun İyonizan, Oksidatif ve Redüktif Etkilerinde Faktör Analizi başlıklı,
Dr. Caner AKTAŞ'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi**
olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25 / 10 / 2011

Prof. Dr. Şaban ÇAKIR GÖKÇE

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Meltem NALÇA ANDREIU

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Ayşe HIÇSÖNMEZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

Üye

Önsöz ve Teşekkür

Tezimin hazırlanmasında ilgi, bilgi ve desteğini esirgemeyen, bana genel radyasyon onkolojisi, radyasyon fiziği, radyasyon biyolojisi nosyonunu kazandıran Sayın Prof. Dr. Şaban Çakır Gökçe Sayın Prof. Dr. Meltem Nalça Andreiu Sayın Doç Dr. Ayşe Hiçsönmez Sayın Doç. Dr. Serap Akyürek ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cengiz Kurtman'a, doku örneklerimin değerlendirilmesine katkıda bulunan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embryoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. M. Kemal Özbilgin'e, verilerimin istatistiksel değerlendirmesine katkıda bulunan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Yüksel Terzi'ye, beraber çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarımla birlikte Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı ve Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına, Gazi Üniversitesi Rektör Danışmanı Sayın Prof. Dr. Orhan Arslan'a ve bana hayatımın her anında desteğini ve sevgisini veren değerli eşim Gülnihal Aktaş'a, biricik oğlum Burak Mert Aktaş'a teşekkür ederim.

Dr. Caner Aktaş

İçindekiler

Sayfa

| | |
|---|-------------|
| Kabul ve Onay | i |
| Önsöz ve Teşekkür | ii |
| İçindekiler | iii |
| Simgeler ve Kısaltmalar Dizini | v |
| Şekiller Dizini | vii |
| Tablolar Dizini | viii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Radyoterapinin Biyolojik Temeli | 3 |
| 2.2. Radyasyona Normal Doku Cevabı ve Büyüme Faktörleri | 4 |
| 2.3. Radyasyona Vasküler Yapının Cevabı ve Vasküler Yapı Histolojisi | 5 |
| 2.4. Fizyolojik, Patolojik Anjiogenez ve Vaskülogenez | 6 |
| 2.5. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezin Moleküler Temelleri | 8 |
| 2.5.1. Vazodilatasyon, Endotelyal Permiabilite ve Perientotelyal Destek | 8 |
| 2.5.2. Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu ve Migrasyonu | 9 |
| 2.5.3. Lümen Oluşumu | 11 |
| 2.5.4. Endotelyal Sağkalım | 11 |
| 2.5.5. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Endotel Farklılaşması | 11 |
| 2.6. <i>Hypoxia-Inducible Factor</i> (HIF) | 12 |
| 2.6.1. HIF'in Oksijen Bağımlı Düzenlenmesi | 13 |
| 2.6.2. HIF'in Oksijenden Bağımsız Düzenlenmesi | 14 |
| 2.7. HIF-1 alfa ve <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) | 15 |
| 2.7.1. Anjiogenez ve Tümör Prognoz | 15 |
| 2.7.2. Metabolizma | 17 |
| 2.7.3. Proliferasyon | 17 |

iii

| | |
|---|-----------|
| 2.7.4. Metastaz | 17 |
| 2.7.5. Diferensiyasyon | 18 |
| 2.7.6. HIF ve Tümör İlişkisi | 19 |
| 2.8. HIF ve Radyoterapi | 20 |
| 2.9. Tümör Anjiogenezinde HIF'den Bağımsız Yollar | 21 |
| 2.10. VEGF'den Başka Anjiogenik Faktörlerin, HIF-1 Bağımsız Aktivasyonu | 24 |
| 2.11. Radyasyon, Reoksijenasyon, HIF-1 alfa, Stres Granülü, Damar Direnci | 24 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |
| 3.1. Radyasyon Uygulaması | 28 |
| 3.2. Deney Hayvan Grupları | 29 |
| 3.3. İmmün Histokimyasal Değerlendirme | 29 |
| 3.3.1 Histokimyasal Skorun (<i>Hscore</i>) Hesaplanması | 30 |
| 3.3.2 Işık Mikroskopisi Gereç ve Yöntemi Parafin Takibi | 30 |
| 3.3.3 Hemotoksilen Eozin Protokolü | 31 |
| 3.3.4 İndirekt İmmün Histokimya Yöntemi | 32 |
| 3.4 İstatistik Analiz | 33 |
| 4. BULGULAR | 34 |
| 4.1. Mesane İmmün Histokimyasal Bulgular | 34 |
| 5. TARTIŞMA | 50 |
| 6. SONUÇ | 62 |
| ÖZET | 63 |
| SUMMARY | 65 |
| KAYNAKLAR | 67 |

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

| | | |
|------------------|---|---|
| Ang- 1 | : | <i>Angiopoetin- 1</i> |
| Ang- 2 | : | <i>Angiopoetin -2</i> |
| AP- 1 | : | <i>Activator Protein -1</i> |
| ARNT | : | <i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i> |
| b- FGF | : | <i>basic- Fibroblast Growth Factor</i> |
| b - HLH | : | <i>basic- Helix-Loop- Helix</i> |
| Cox- 2 | : | <i>Cyclooxygenase- 2</i> |
| CXCR4 | : | <i>Chemocine Receptor 4</i> |
| EC | : | <i>Endothelial Cell</i> |
| EGF | : | <i>Endothelial Growth Factor</i> |
| eIF2 | : | <i>eukaryotic Initiation Factor 2</i> |
| Ep | : | <i>Epithelium</i> |
| EPO | : | <i>Erythropoietin</i> |
| ES | : | <i>Embryonic Stem Cell</i> |
| GM-CSF | : | <i>Granulocyte Monocyte - Colony Stimulant Factor</i> |
| GTP | : | <i>Guanosin Triphosphate</i> |
| HE | : | <i>Hematoxylin - Eosin</i> |
| HERs | : | <i>Hypoxia Regulator Element</i> |
| HIF | : | <i>Hypoxia Inducible Factor</i> |
| IGF -1 | : | <i>Insulin Like Growth Factor-1</i> |
| IL | : | <i>Interleukin</i> |
| LET | : | <i>Lineer Enerji Transferi</i> |
| LP | : | <i>Lamina Propria</i> |
| MMP | : | <i>Matrix Metalloproteinase</i> |
| mRNA | : | <i>messenger RNA</i> |
| NF-kB | : | <i>Nuclear Factor- kappa B</i> |
| NO | : | <i>Nitric Oxide</i> |
| ODD | : | <i>Oxygen-dependent Degradation Domain</i> |
| PDGF | : | <i>Platelet Derivated Growth Factor</i> |
| PECAM- 1 | : | <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule- 1</i> |
| PGE ₂ | : | <i>Prostagalandin E₂</i> |
| PI- 3K | : | <i>Phosphatidylinositol – 3 Kinase</i> |
| PLGF | : | <i>Placental Like Growth factor</i> |
| RCC | : | <i>Renal Cell Cancer</i> |
| ROS | : | <i>Reactive Oxygen Specie</i> |
| SDF- 1 | : | <i>Stromal Derivated Factor-1</i> |
| TGF- beta | : | <i>Transforming Growth Factor – beta</i> |
| TIA- 1 | : | <i>T- Cell Intracytoplasm Antigen-1</i> |
| Tie | : | <i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology</i> |
| TNF | : | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| tRNA | : | <i>transferring RNA</i> |
| TSP- 1 | : | <i>Thrombospondin -1</i> |
| VEGF | : | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| VEGF- 1 | : | <i>Vascular Endothelial Growth Factor -1</i> |
| VEGF- 2 | : | <i>Vascular Endothelial Growth Factor -2</i> |

VEGFR : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
VHL : *Von Hippel Lindau*

Şekiller Dizini

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.3.1. Tipik Damar Duvar Yapısı | 5 |
| Şekil 2.9.1. Hipoksi Bağımsız Yol | 22 |
| Şekil 3.1.1. Resim Radyasyon Alanı | 28 |
| Şekil 4.1.1. Resim Mesane Hematoksilen-Eozin | 34 |
| Şekil 4.1.2. Resim Mesane VEGF | 35 |
| Şekil 4.1.3. VEGF Grupların Ortalama Değerleri | 37 |
| Şekil 4.1.4. Resim Mesane eIF2 | 38 |
| Şekil 4.1.5. eIF2 Grupların Ortalama Değerleri | 40 |
| Şekil 4.1.6. Resim Mesane HIF-1 | 41 |
| Şekil 4.1.7. HIF-1 Grupların Ortalama Değerleri | 43 |
| Şekil 4.1.8. Resim Mesane TIA- 1 | 44 |
| Şekil 4.1.9. TIA- 1 Grupların Ortalama Değerleri | 46 |
| Şekil 4.1.10. Resim Mesane TSP- 1 | 47 |
| Şekil 4.1.11. TSP-1 Grupların Ortalama Değerleri | 49 |

Tablolar Dizini

| | Sayfa |
|--|-------|
| Tablo 4.1.1. Çoklu Karşılaştırma VEGF | 36 |
| Tablo 4.1.2. Çoklu Karşılaştırma eIF2 | 39 |
| Tablo 4.1.3. Çoklu Karşılaştırma HIF-1 | 42 |
| Tablo 4.1.4. Çoklu Karşılaştırma TIA- 1 | 45 |
| Tablo 4.1.5. Çoklu Karşılaştırma TSP-1 | 48 |
| Tablo 4.1.6. Grupların Boyanma Özellikleri | 49 |

1. GİRİŞ

Radyoterapi kanser için efektif bir tedavidir. Kanser, hücrelerin anormal mitozu sonucunda kontrolsüz büyüyen, çevre hücre ve dokulara invazyon yolu veya kitle etkileriyle zarar verip onların görev ve fonksiyonlarını bozabilen kontrolsüz çoğalan hücre ve hücreler topluluğu olarak da isimlendirilen hastalıktır.

Bir dokunun yaşaması ve fonksiyonlarını devam ettirmesi, büyüüp çoğalabilmesi için o bölgenin vasküler yapısının sağlıklı olması gerekir. Doku için oksijen olması gereken en temel faktördür. Kanser hücrelerinin beslenmesi, büyümesi, çoğalması ve uzak organlara yayılması damarsal yapıların etkisi ile olabilmektedir. Daha önce hasarlı olan vasküler yapıların yerine yeni vasküler yapılar oluşur iken vasküler endotel hücreleri arasındaki bağların farklı ve zayıf gelişimi ile metastaz riski artmaktadır [1].

Radyoterapi ile tümör hücre ve dokusu hedef alınarak yapılan tedavilerde vasküler, paravasküler yapılarda, normal doku ve hücrelerde de letal, subletal, potansiyel letal hasarlar oluşabilir. İyi vasküler yapıya sahip tümör hücreleri radyasyona daha hassas iken vasküler yapısı ve oksijenlenmesi kötü tümöral yapılar radyasyona daha dirençli olarak davranırlar. Normal damar endotelinin ve tümör damar yapısının radyasyon tedavisine vereceği yanıt önemlidir.

Radyasyonun iyonizan etkisi atom yörüngesinden bir elektron uzaklaştırılmasıdır. Oksidasyon (yükseltgenme) elektronların atomdan ayrılmasını sağlayan tepkimedir. H₂O molekülü ile iyonize radyasyonun girdiği tepkimede oluşan ROS (*Reactive Oxygen Species*), oksidasyonun sonucudur. Redüksiyon (indirgenme) olayı da atomun bir veya daha fazla elektron almasını sağlayan tepkimedir. Oksidasyon ile açığa çıkan elektronun bir başka atom tarafından alınması olarak tanımlanabilir. Radyasyon; iyonizasyon, oksidasyon ve redüksiyon etkileri ile normal doku ve tümör dokusu üzerinde hipoksik stres oluşturabilir. Radyasyon tedavisi, DNA çift sarmal kırıkları oluşturarak direkt hücre ölümüne neden olurken, ROS oluşumu da hücre ölümü nedenidir. ROS ile NF-kB (*Nücleer Factor kappa B*)

ve IL- 8 (*Interleukin-8*) anjiogenez yolunda yer alan, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) oluşumunu HIF (*Hypoxia Inducible Factor*) bağımsız yol üzerinden başlatabilir.

Radyasyonun iyonizan, oksidatif ve redüktif etkileri ile HIF, endojen mitojen olan VEGF ve hücrenin strese cevabını belirleyen eIF2 (*eucaryotic Initiation Factor 2*), TIA-1 (*T- Cell Intracytoplasm Antigen-1*) gibi faktörler ortaya çıkabilir. TSP-1 (*Thrombospondin- 1*) strese cevap olarak ortaya çıkabilecek bu faktörleri inhibe eden endojen anti-anjiogenik faktördür. TSP-1 dışındaki faktörlerin anjiogenez oluşumu sırasında ortaya çıktığı bilinmektedir [2-4].

Hipotezimiz iyonizasyon, oksidasyon ve redüksiyon tepkimeleri sonucunda, radyasyonun normal vasküler endotelde oluşturduğu stres ve hipoksiye bağlı ortaya çıkabilecek, HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1, TSP-1 arasında ilişki olup olmadığı, buna bağlı olarak anjiogenez yolu uyarılabileceği varsayımıyla ortaya çıkabilecek faktör analizleri ile bu konu daha iyi anlaşılabilir. Bu faktörler normal vasküler endotelin strese olan cevabını gösterebilirler. Normal vasküler endotel hücrelerinde oluşan hipoksik stres sonucunda, endotel hücrelerinin apoptoza gitmesi strese karşı oluşan cevabı daha da artırarak belirgin hale getirebilir. Radyasyon normal vasküler endotelde hasar oluşturup fizyolojik anjiogenezi başlatabilir.

Bu varsayımınla amaçlanan, radyasyonun normal vasküler endotelde oluşturduğu stres ve hipoksik duruma yanıt olarak fizyolojik anjiogenezi başlatabilen pozitif faktör olan HIF-1 alfa artışı ile ortaya çıkabilen VEGF ve apoptozu belirleyen TIA-1, anjiogenezi inhibe eden endojen salınan TSP-1 düzeylerinin, stres granülü belirleyici olarak bilinen eIF2'nin immün histokimyasal olarak belirlenmesi olacaktır. Ayrıca normal vasküler endotelde iyonize radyasyon uygulaması ile anjiogenez yolunda pozitif faktör olan HIF-1, VEGF, eIF2 ve TIA-1 ile negatif etkili TSP-1 arasındaki ilişkinin nasıl olduğu sorusuna yanıt aramaktır. Çalışmada, anjiogenez yolunda görev yapan; HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1 ve TSP-1 değişken durumları ile 24 saat, 48 saat ve 7 günde aralarındaki ilişki immün histokimyasal yöntemle gösterilmektedir

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Radyoterapinin Biyolojik Temeli

İyonize radyasyon ile hücre ölümünün birincil mekanizması DNA hasarıdır. DNA hasarı çoğunlukla onarılabılır ancak çift zincir kırıkları ölümcül olmaktadır. Hücrelerin yaklaşık %85 'ini su oluşturmaktadır. İyonize radyasyonun su molekülünü iyonlaştırması sonucunda oluşan serbest radikaller de DNA hasarını dolaylı yoldan gerçekleştirebilir. Etkilerin % 65'i bu dolaylı yol ile oluşmaktadır. Ortamda oksijen varlığı serbest radikal oluşumu için son derece önemlidir. Radyasyona maruz kalan su (H₂O) iyonize duruma geçer. $H_2O \rightarrow H_2O^+ + e^-$ su molekülü serbest elektron (e⁻) oluşturur. Bu serbest e⁻ başka bir su molekülü ile etkileşime girer ve $e^- + H_2O \rightarrow H_2O^-$ şeklinde su molekülü oluşur. Oluşan (+), (-) su molekülleri $H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH$ ve $H_2O^- \rightarrow H + OH^-$ şeklinde H⁺ ve OH⁻ iyonları oluşturur. H ve OH serbest radikalleri, diğer serbest radikaller veya diğer moleküller ile etkileşebilirler. Bu olaylar zinciri radyasyonun iyonizan, oksidatif ve redüktif etkilerini açıklamaktadır. Bu etkiler sonucu anjiogenez yolunda pozitif ve negatif görev yapan faktörler ortaya çıkabilir. Serbest radikal oluşumu partiküler olmayan radyasyon ile daha fazla görülür. Yüksek LET (Lineer Enerji Transferi) li enerji taşıyanlarda daha çok direkt etki (DNA çift zincir kırıkları) gerçekleşir [5, 6].

Ortamda bulunan sülfidril molekülleri serbest radikallere bağlanarak hasar düzeyini düşürebilir. Dokuların radyasyona cevabı direkt olarak radyasyonun sitotoksik etkilerine bağlı olmayabilir. Özellikle tümör dokusunun cevabı tümörü besleyen damar hasarı ile yakın ilişkilidir. Kombine tedavi modelleri, biyolojik ve kemoterapi ajanları tümör kan akımını düzenleyerek radyasyonun dolaylı etkisine katkıda bulunabilir [5].

2.2. Radyasyona Normal Doku Cevabı ve Büyüme Faktörleri

Birçok büyüme faktörü, sitokin ve bazı ufak moleküllerde yeni kan damarı oluşumuna katkıda bulunabilir. Bunlar arasında öne çıkanlar FGF, PDGF, TGF-alfa, TGF-beta, IL-8 ve VEGF dir. FGF ve PDGF ailesinin üyeleri normal gelişim esnasında bol miktarda bulunurlar, ancak dışarıdan uygulandıklarında mezenşimal ve enflamatuvar hücreleri çekerek anjiogenezi pozitif yönde etkilerler. TGF ve TNF endotel hücre büyümesini uyarır veya inhibe edebilir [7].

b-FGF (*basic-Fibroblast Growth Factor*) : Endotel hücre büyümesini indükler, radyasyona bağlı apoptozu inhibe eder, bu sayede mikrovasküler hasarı önler. bFGF strese cevap olarak salınır. Stres radyasyon, ısı, hipoksi, kimyasallardan biri olabilir. bFGF, radyasyona bağlı geç yan etkileri azaltıcı rol oynamaktadır. Dallanan orta çaplı kapillerde, dallanmayanlara göre daha yüksek bFGF konsantrasyonlarına rastlanmıştır. Bu nedenle mikrovasküler koruma dallanan arterlerde daha etkilidir. Radyasyona bağlı geç yan etkilerin damar hasarına bağlı olduğuda göz önüne alınırsa, radyasyona tolerans geniş damarlanması olanlarda daha yüksek, dallanmayan kapiller yakınında düşüktür [7].

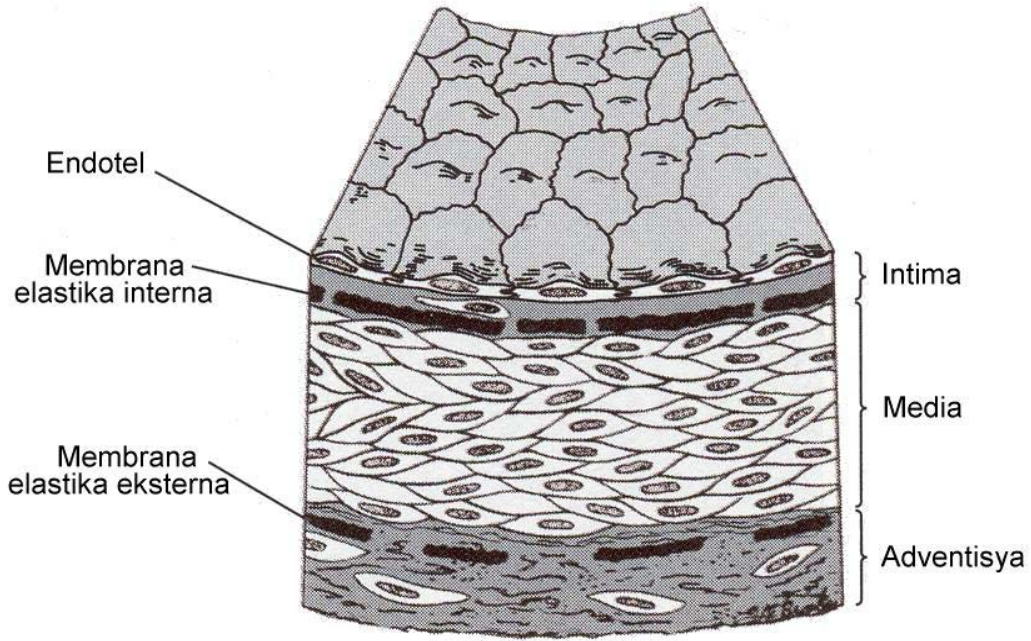
PDGF (*Platelet Derivated Growth Factor*) : Vasküler dokudaki hasarı artırır. Organ gelişiminde önemli rolü vardır. Ayrıca fibrozis, atherosklerozis, glomerülonefrit ve agresif fibromatozis gibi patolojik süreçlerle ilişkilidir [7, 8]. Hatta otokrin stümilasyon ile anormal PDGF üretimi, PDGF reseptör pozitif hücrelerin neoplastik dönüşümüne neden olabilir [8].

TGF-beta (*Transforming Growth Factor – beta*) : Pnomonide olduğu gibi güçlü olarak inflamatuvar cevabı indükler. Bağ dokusu gelişimini uyarır. Epitel hücre çoğalmasını inhibe eder. Radyasyonun geç yan etkilerinden olan fibrozis ve vasküler hasar TFG-beta ile artar. IL-1 ve TNF (*Tumor Necrosis Factor*) seviyesini düşürerek hematopoetik doku hasarını artırır [9].

TNF (Tumor Necrosis Factor) : Sinyal yollarını başlatan reseptörleri bağlayarak monositlerin ve tümör hücrelerinin neden olduğu inflamatuvar cevaba eşlik eden sitotoksik ajandır. Fibroblastların, inflamatuvar hücrelerin ve endotel hücrelerin çoğalmasını uyarır. Geç komplikasyonlarla ilişkilidir [9]. TNF klinik çalışmalarda uygulanan kişilerde halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı ve geçici lökopeniye neden olur. TNF hematopoetik hücreleri korur ve tümör hücrelerini duyarlı hale getirir. Pnomoni, karaciğer fonksiyon bozukluğu, böbrek yetmezliği ve demiyelinezasyon şiddeti ile ilişkilidir. Radyasyona bağlı SSS (Santral Sinir Sistemi) patofizyolojisinde rol oynar. Radyasyondan sonra salınan TNF transkripsiyonel olarak düzenlenir ve bu olayda protein –kinaz C bağımlı yol rol oynamaktadır [9].

2.3. Radyasyona Vasküler Yapının Cevabı ve Vasküler Yapı Histolojisi

Kapiller damarlar ve venüller dışındaki tüm kan damarları genel olarak 3 tabakadan oluşur.



Şekil 2.3.1. Tipik Damar Duvar Yapısı [8].

Tunika İntima: (İç tabaka) İçte endotel hücre dizisi, bunun altında bazal lamina ve gevşek fibro elastik bağ dokusundan oluşan subendotelyal tabakadan meydana gelmiştir. Subendotelyal tabakanın dış kısmında elastik fibrillerden oluşan membrana elastika interna vardır. Bu tabakada nadiren de olsa kas tabakası bulunabilir.

Tunika Media (Orta tabaka): Esas olarak sirküler olarak düzenlenmiş düz kas hücrelerinden meydana gelmiştir.

Tunika Adventisya (Dış tabaka): En dış tabakadır, daha çok uzunlamasına düzenlenmiş kollojen ve elastik fibrillerden oluşmuştur [8].

Kan damarları üzerinde radyasyon etkisi önemlidir, çünkü farklı doku ve organda oluşan geç hasar damar üzerine olan etkinin azaltılmasıyla önlenebilir [7]. Damarların tunika intima tabakasında yer alan endotel hücrelerinin kalınlığı damar tipine bağlıdır. Normal damar endotelinde hücre proliferasyon oranı düşüktür. Radyasyon uygulanması sonrası mitozla giren hücreler bir süre sonra ölür. Canlı kalan hücrelerin anormal proliferasyonu sonrası kontraksiyon bölgeleri meydana gelir. Bu durum damar endotel dökülmesi, tromboz oluşumu ve kapiller nekroza yol açar. Damar düz kas hücrelerinde, siklusta hücre sayısı az olduğundan bu grup hücre sayısının düşüşü ışınlamadan sonra birkaç yıl sürebilir. Kas liflerinin yerini kollojen fibriller alır, damar elastikiyeti bozulur ve kan akımı azalır. Arter harabiyeti konvansiyonel fraksiyonda 50-70 Gy de, kapiller harabiyet 40 Gy den sonra başlar. Venler radyasyona arterlerden daha az duyarlıdır [7].

2.4. Fizyolojik, Patolojik Anjiogenez ve Vaskülogenez

Fizyolojik anjiogenez yara iyileşmesi, menstrüel siklus, embiryogenez gibi durumlarda söz konusudur. Patolojik anjiogenez ise başta tümörler olmak üzere kollojen doku hastalıklarından romatoid artrit, retinopatiler ve psöriasis gibi hastalıklarda görülebilirler [1, 10-13].

Onkolojide patolojik anjiogenez tümör dokusunda görülür. Kanserli hastalara antianjiogenik tedavi ile tümör etrafındaki damar yapımı bloke edilerek özel tedavi

yaklaşımları uygulanmaktadır [14, 15]. Tümör anjiogenez yapmadan önce, çevre dokulardan sadece basif difüzyon ile beslenir. En fazla 0.5-1 cm³ hacme kadar büyüyebilir. Daha fazla çoğalmak ve metastaz yapabilmek için anjiogenez gereklidir [14].

Anjiogenez önceden var olan kan damarlarından yeni damarlarının geliştiği süreçtir [16, 17]. Kendisine çok benzer olan vaskülogenez ve lenfanjiogenezden ayırt edilmesi gerekir. Vaskülogenezde endotelial ve hematopoetik hücreler ortak progenitör olan hemanjioblastları paylaşırlar. Yolk kesesinde hemanjioblastlar, içteki hücrelerin hematopoetik prekürsörlere ve dıştaki hücrelerin endotel hücrelerine dönüştüğü topluluklar oluştururlar. VEGF, VEGFR-2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*) ve bFGF anjioblast farklılaşmasını etkileyen faktörlerdir [18, 19]. VEGFR-1 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*) hemanjioblast gelişimini durdurur [20].

Endotel hücrelerinin patolojik koşullarda anjiogenik hale gelme kararı anjiogenik 'switch' olarak adlandırılır. Endotel hücrelerinin kaderini yönlendiren bu mekanizmalar hakkında çok şey bilinmemekle beraber bu konuda Ets- 1, Hex, Vezf1, Hox ve GATA gen aile üyeleri yer alıyor olabilirler. Bu moleküller terapötik açıdan da önemli olabilirler [21].

Endotelial öncüllerin sadece embriyonik yaşamda buldukları sanılırdı. Anjiogenez önceden embriyonik süreçte primitif hücrelerden yeni kan damarlarının de-novo (sıfırdan) formasyonu olarak ifade edilirdi. Ancak erişkin kemik iliğinde ve periferik kanda da endotelial öncül hücreler tanımlanmıştır. Bu hücrelerin farklılaşması ve hareketlenmesi VEGF, GM-CSF (*Granulocyte Monocyte - Coloni Stimulant Factor*), bFGF ve IGF-1'ü (*Insulin Like Growth Factor*) uyarmaktadır [22]. Fakat kemik iliği ve dolaşımda bulunan endotelial prekürsör (öncül) hücrelerin de bazı durumlarda anjiogeneze katkıda bulunabileceklerinin gözlemlenmiş olması bu ayrımın sınırlarını biraz bulanık hale getirmiştir. Anjiogenez genel olarak küçük damar formasyonunu ifade etmektedir. Anjiogenezin embriyodaki moleküler temeli,

erişkindeki patolojik moleküler temelden farklı olabilir. Bunun çok sayıda aşaması ve evresi tanımlanmıştır [21, 22].

2.5. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezin Moleküler Temelleri

2.5.1. Vazodilatasyon, Endotelial Permiabilite ve Periendoelital Destek

Anjiogenez, NO (*Nitric Oxide*) ilgili süreç olan vazodilatasyon ile başlar. Vasküler geçirgenlik VEGF'e yanıt olarak artar. Plazma proteinleri ekstravaze (damardışı) olur. Jel formasyonuna gelen ekstrasellüler çevre, migrasyon (göç) yapıp damar dışına çıkan endotel hücreleri için yapı iskeleti görevi görür. Geçirgenlikteki artış, fenestra formasyonu, vezikülo vakuoler organellerin formasyonu, PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecul- 1*) ve VE-cadherin'in (Vasküler Endotelial-cadherin) redistrüksiyonu aracılığı ile meydana gelir. Permiabilite anjiogenez için iyi olmakla birlikte, aşırı vasküler kaçak nedeniyle dolaşım kollapsı ve intrakranial hipertansiyon, tümör hücrelerinde metastaz, premenstrüel rahatsızlıklar ve körlüğe neden olabilir. Endotele özgün Tie-1 ve Tie-2 (*Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology*) reseptörleri selektif olarak endotel hücreleri üzerinde bulunan ve embriyonik vasküler yapı oluşumu için gerekli olan moleküllerdir. Tie-2 reseptörünün bir ligantı olan Ang-1 (*Angiopoetin- 1*) erişkinde damara uygulandığında plazma kaçağını engellemektedir [23, 24]. Endojen anjiogenez aktivatör olan Ang-1, kapiller damarları güçlendirir. Perisitleri stabilize ederek endotel hücre yaşam süresini artırarak yeni oluşan vasküler yapıyı güçlendirir [25, 26].

Endotel hücre migrasyonu için, hücreler arası temasın gevşemesi ve periendoelital hücre desteğinin kalkması gerekir. Endotel Tie-2 reseptör sinyali inhibitörlerinden, Ang-2 (*Angiopoetin-2*) damarları destabilize eder. Yoğunlukla yeni damar yapım bölgelerinde artmış olarak bulunur. Matriks gevşemesinde rol oynar. Ang-2'nin, destabilizatör etkisi belki de vasküler yapıyı tümör dokusunda VEGF gibi mitojen ajanlara daha duyarlı hale getirmektedir [27, 28]. Proteinazlardan, plazminojen aktivatörü, MMP (*Matrix Metalloproteinaz*), kimaz ya da heparinaz

aileleri matriks moleküllerini parçalayarak ve ekstrasellüler matriks içinde bulunan büyüme faktörlerini (bFGF, VEGF, IGF-1)serbestleştirerek anjiogenezi etkilemektedir [29].

2.5.2. Endotel Hücrelerinin Proliferasyonu ve Migrasyonu

Prolifere olan endotel hücreleri yolları belli olduktan sonra yeni damar oluşum bölgelerine gider. VEGF, PLGF (*Placental Like Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve bunların reseptörleri VEGFR-2, VEGFR-3, nörofilin-1 özel fonksiyonlara sahiptir. VEGF ve reseptörü VEGFR-2 embiryonik, patolojik ve neonatal anjiogenezi tetikler. Farklı VEGF formlarının veya bu ailenin heterodimerlerinin bu süreçteki rolü ve mekanizmaları tam olarak aydınlatılmış değildir. Örneğin VEGF-120 anjiogenezi tek başına başlatabilir ancak süreci tamamlayamaz [30]. VEGFR-3 hem embiryonik anjiogeneze hemde patolojik anjiogeneze eksprese edilir. VEGFR-3'ün ligantı olan VEGF-C erişkin patolojilerinde anjiogeniktir [31, 32].

VEGFR-1'in tirozin kinaz domaini embiryonik anjiogenezi bozmamaktadır. Ancak VEGFR-1'in patolojik anjiogeneze hangi rolü üstlendiği belirsizdir. PLGF'ün ortamdan kaybı patolojik anjiogenezi bozmakta fakat fizyolojik anjiogenezi etkilememektedir. VEGF-B kaybı koroner oklüzyon sonrasında koroner fonksiyonları etkilemektedir. Ang-1, Tie-2'nin eriyebilen formu, tirozini fosforile eder. Endotel hücreleri için kemotaktiktir, tomurcuklanmayı indükler. VEGF'ü potansiyelize eder, fakat endotel proliferasyonunu indükleyemez [2] . VEGF aksine Ang-1 tek başına endotel ağ organizasyonunu başlatamaz ancak VEGF tarafından başlatılan ağları sağlamlaştırır. Bu etki endotel hücreler ve periendotel hücreler arasında etkileşim sitümüasyonu ile olmaktadır. Bu durum Ang-1'in, VEGF den daha geç aşamada etki gösterdiğini düşündürmektedir. Ang-2, VEGF varlığında anjiogeniktir [2, 22].

bFGF ve PDGF, mezenşimal ve inflamatuvar hücreleri bir araya getirerek anjiogenezi etkiler. PDGF timidin fosforilaz etkisi gösterir. Timidini, timine

defosforilize ederek serbest oksijen radikali oluşumunu artırır ve anjiogenez genlerini aktive eder [33]. FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*), bFGF ve PDGF gibi heparine bağlanan anjiogenik proteindir. FGF, endotel hücrelerinde proliferasyon ve epiblast hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşmasını sağlar. bFGF doğrudan ve dolaylı olarak endotel hücre aktivitesini düzenler. Güçlü endotel hücre stimülatörü olan bFGF, endotel migrasyonu, proliferasyonu ve tüp formasyonundan sorumludur [34]. bFGF ile VEGF anjiogenez üzerine sinerjistik etki gösterdikleri bilinmektedir. Ancak farklı olarak bFGF'süz ortamda yapılan fare deneylerinde yeniden damar oluşumunun gözlenmesi bFGF'ün özellikle erişkin vasküler yapı korunması ve yara iyileşmesinde etkili olduğunu düşündürmektedir [35]. PDGF ve bFGF, heparine bağlı peptid yapıda büyüme faktörleri olarak VEGF gibi tirozin kinaz reseptörleri üzerine etki ederek, dimerizasyon, otoposforilasyon ve sonuçta mAPK (mitojen Aktive eden Protein Kinaz) gibi hücre içi kinazların aktivasyonunu sağlarlar. Böylece AP-1 (*Activator Protein-1*) gibi transkripsiyon faktörlerini uyararak, mitojenik etkili genlerde cevap oluştururlar [36].

TGF-beta (*Transforming Growth Factor-beta*) tümör anjiogenezinde, endotel hücrede kemotaktik olarak görev yapar. Bunu *tenascin* gibi endotel hücre yapışmasını ve göçünü sağlayan matriks proteinlerinin yapımını artırarak gerçekleştirir. Bu sayede tümör hücre invazyonu ve metastazında rol oynarlar. Ayrıca VEGF ve VEGFR ekspresyonunu da uyararak anjiogenez de proliferatif aşamada rol alırlar [37].

TNF-alfa'da endojen mitojen, anjiogenez ve VEGF ekspresyon indükleyici olarak görev yapmaktadır. TGF-beta ve TNF-alfa, endotel hücre büyümesini inhibe veya stimüle ederek tümör progresyonunu belirleyebilir [32].

VEGF'den sonraki basamaklarda, VEGF efektörü olarak görev yapan NO, TGF-beta ve diğer anjiogenik faktörler, embriyonik vasküler gelişim için zorunlu değildirler, ancak patolojik anjiogenezini etkileyip damarların tekrardan endotelizasyonunu geliştirirler [38, 39].

2.5.3. Lümen Oluşumu

Damar iç kısmını döşeyen endotel hücrelerinin, kordon şeklinde bir araya gelmesi, endotel hücrelerinin incilmesi, önceden var olan damarlarla birleşmesi, damarda çap ve uzunluk artışına neden olur. Tümör damarları ve patolojik anjiogenez de damar yapısı, normal yapıya göre anormal genişler. Fakat tümör damarında, normal damar yapısına göre kan akımı yönü tam anlaşılır değildir, türbülant bir akım vardır. Bu akım metabolik ihtiyaçları tam karşılayamadığı gibi akım hızı da oldukça yavaştır [40].

VEGF-189 lümen çapını azaltır. VEGF-121, VEGF-165 ve reseptörleri lümen oluşumunu, damar çapını artırır. Ang- 1 de VEGF ile kombine bir şekilde damar ve lümen çapını artırır [2]. Lümen oluşumunu etkileyen diğer moleküller, integrinler ve MEF2C (*Myocyte Enhancer binding Factor 2C*) transkripsiyon faktörüdür. Hücre dışında çok fazla proteoliz, endotel hücrelerinin kistik olarak toplanmasına neden olup, tüp oluşumunu engelleyebilir. TSP-1'de lümen oluşumunda endojen inhibitör olarak görev yapar [3].

2.5.4. Endotelyal Sağkalım

Endotel hücreleri damar oluşumunu tamamladıktan sonra, her hangi bir stres faktörü ile karşılaşmadıkları takdirde uzun yıllar canlı kalabilirler [41]. Endotel apoptozu, damar lümeninin spazm ile daralması, trombus tarafından tıkanması veya ölü hücrelerin lümene dökülmesi sonucu oluşan tıkanıklık nedeniyle başlayabilir [30, 42].

2.5.5. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Endotel Farklılaşması

Patolojik anjiogenez ve tümör hücrelerinde yer alan endotel hücreleri, birçok anormallik gösterir. Çok katlı olarak oluşur, damarları bölen ve köprüleyen çıkıntılar yapar. İntrasellüler ve transsellüler delikler içerir, kontrolsüz bir geçirgenlik sergiler ve sürekli yeniden şekillenmeye gider. Tümör damarlarının, hem endotel hemde tümöre ait hücreler içermeleri onları mozaik bir yapı haline getirir. Kanser

tedavisinde bu bölgelere proapoptotik veya trombotik moleküllerin yapışması cazip hedef oluşturur. Mikro çevresel faktörlerde tümör endotel bariyerini belirleyebilmektedir. Cilt tümörleri, beyin tümörlerinden daha fazla fenestra içermektedir [16].

Fizyolojik anjiogenez gelişmekte olan fetusta başlar ve doğum sonrasında normal kan damarlarını oluşturacak şekilde devam eder. Normal kan damarları düzenli ve bir birinden yakın boşluklarla ayrılmış bir dağılım gösterir. Elastik, musküler arter, arteriol, kapiller, post kapiller venüller ve ufak, büyük venler şeklinde hiyerarşik bir düzenlenmeye sahiptir. Patolojik anjiogenez tarafından uyarılan damarlar ise düzensiz dağılır, dallanır, arterio-venöz şantlar oluşturur. Hiyerarşik yapıya uymazlar. Yapısal ve fonksiyonel olarak heterojendir. Yüksek derecede geçirgendir [16].

2.6. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)

Tümör hipoksisi 1950'lerde radyoterapi başarısızlığının nedeni olarak tanımlanmıştı. Bugün tümör ve normal doku hipoksisi ve hipoksinin moleküler mediatörlerinin, HIF ve tümörogenезin birçok basamağını düzenlediği bilinmektedir [43]. HIF hem oksijen sağlanmasını, hem de gen ekspresyonunu düzenleyerek oksijen eksikliğine uyumu sağlar. Glukoz *uptake* ve metabolizmasını düzenler. Anjiogenez, eritropoez, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi pek çok hücrenel süreci de etkiler [44].

HIF-1, ailenin ilk üyesidir. HIF-1, Hep3B hücrelerinde EPO'nun (*Erythropoietin*) hipoksik aktivasyonu için gereken faktör olarak tanımlanmıştır [45]. Yapısal analizler HIF-1 alfa proteininin 4 alan içerdiğini göstermiştir. 1) bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) bölgesi DNA bağlanması ve dimerizasyondan sorumludur. 2) PAS, dimerizasyon ve hedef gen spesifitesinden, 3) ODD (*Oxygen-dependent Degradation Domain*) *ubiquitin proteasome* yolundaki bozulmadan, 4) C-terminal bölgesi lokalize transaktivasyondan, hipoksi bağlı nükleer lokalizasyon ve protein stabilizasyonundan sorumludur [46, 47].

HIF-2 ailenin ikinci üyesidir. HIF-1 ile % 48 oranında aminoasit benzerliği gösterir [48, 49]. HIF- 2 alfa ve HIF- 1 alfa yapısal olarak benzer ve bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), PAS ve ODD motifleri içerir. HIF-2 alfa heterodimerleri de gen ekspresyonunu indüklüeyebilir. HIF-1 alfa'nın aksine HIF-2 alfa ekspresyonu endotelial hücreler, glial hücreler, tip II pnömositler, kardiyomyositler, böbrek fibroblastları, pankreas, duodenum interstisiyel hücreleri ve hepatositler gibi özelleşmiş hücrelerden oluşmaktadır [50, 51].

HIF-3 alfa ailenin 3. üyesidir ve HIF-1 alfa ile % 57, HIF-2 alfa ile % 53 oranında aminoasit benzerliği gösterir. *In vitro* olarak hipoksi yanıt elemanlarına bağlanabilir. Ancak HIF-3 alfa'nın *in vivo* hipoksi yanıtında ki rolü tam olarak anlaşılamamıştır [52]. HIF-3 alfa'nın birçok varyantı vardır, en iyi anlaşılanı IPAS'dır (*Inhibitory Domain PAS*). HIF-3 alfa, mRNA'sı (*messenger RNA*) timus, akciğer, beyin, kalp, böbrek, karaciğer, göz gibi dokularda görülebilir [53].

ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) tüm bHLH, IPAS ailesi üyeleri için genel bağlanma yeridir. ARNT, HIF- 1-2-3 alfa subünitlerini heterodimerize eder. ARNT'de bHLH, PAS ve transaktivasyon alanları içerir. Ancak ODD alanı yoktur bu nedenle aerobik şartlardaki hücrelerden eksprese edilirler [54]. ARNT'ye ek olarak başka bir HIF-beta subüniti, ARNT2 ve HIF alfa proteinleri ile heterodimerizasyon yapabilir. Ancak ARNT ve ARNT2 ekspresyon paterni olarak farklılık göstermektedir [55, 56].

2.6.1. HIF'in Oksijen Bağımlı Düzenlenmesi

HIF-1'in ilk düzenleyicisinin O₂ olduğu bilinmektedir. Normoksik şartlarda HIF, VHL (*Von Hippel-Lindau*) aracılığı ile *proteosomal* azalma yapar. VHL'nin HIF-1 alfa'nın oksijen bağımlı parçası ile birleşen E3 *ubiquitin* lipaz kompleks komponenti olduğu gösterilmiştir. Hipoksizde HIF-1 alfa subünitleri stabilize olarak, nükleusa transloke olurlar [57, 58]. Hücre kültürü çalışmaları, HIF stabilizasyonu ve

DNA bağlanma aktivitesinin O₂ konsantrasyonu % 6'dan düşükken aktive olduğu ve % 0,5 O₂ konsantrasyonunda maksimuma ulaştığı gösterilmiştir [59].

Daha önceki çalışmalar, hipokside HIF protein seviye düzenlenmesinde ROS'un önemli rolü olduğunu göstermiştir. Birçok çalışma, mitokondrial elektron transport zincirinin ve ROS üretim inhibisyonunun hipoksik koşullarda HIF stabilitesini azalttığını göstermiştir [60, 61].

HIF-1 alfa subüniti hipoksi tarafından düzenlenir. HIF-1 alfa yolundaki sensör, O₂ bağımlı hidroksilazlardır. Bir tanesi HIF-1 alfa azalması sonucu olarak O₂ ve Fe (demir) varlığında *proline* rezidüleri 402 ve 564 ü hidroksilize eden prolin hidroksilazdır [62-64].

2.6.2. HIF'in Oksijenden Bağımsız Düzenlenmesi

Onkogenler HIF-1 için ikinci düzenleyicidir. Birçok onkogenin HIF-1 alfa üzerine etkisi vardır. Bazıları HIF-1 alfa'nın protein stabilitesi ve azalmasında rol oynarken, diğerleri aktive sinyal yolunda görevlidir. P53 ve VHL gibi tümör süpresör genler HIF-1'in seviyesi ve fonksiyonunu etkiler. P53 proteinin *wild* tipi, endojen anjiogenez inhibitörü olarak görev yapan TSP-1'i uyarır. HIF-1 aktivitesini inhibe eder. P53 kaybı veya mutasyonunda, hipoksi ile birlikte HIF-1 alfa birikimine bağlı, tümör hücrelerinde ve normal dokuda endojen mitojen görev yapan VEGF ekspresyonu olmaktadır [65-67]. PI-3K (*Phosphatidylinositol – 3Kinase*) antagonisti, tümör süpresör bir gen olan PTEN, *phosphatidylinositol biphosphate* ve *triphosphate*'in 3 pozisyonundaki fosfatı kopararak etki eder. PTEN'in tümör süpresör fonksiyonunu kaybetmesi HIF-1 aracılı gen ekspresyonunu artırır [68]. Yüksek miktarda HIF-1 alfa eksprese eden insan tümörlerinde Akt-1 ve Akt-2 amplifikasyonu oldukça sıktır [47]. Değişik onkogenlerin ve büyüme sinyal yollarının aktivasyonu hipoksik olmayan hücrelerde de HIF sistemini uyarabilir. V-src veya ROS V12 onkogenleri ise normoksik HIF-1 alfa'nın stabilizasyonunu sağlar [64].

HIF için 3. düzenleyici grup, büyüme faktörleri, stromal ve parankimal hücrelerden salınan EGF (*Endothelial Growth Factor*), TGF-alfa, IGF, heregulin ve IL-1 beta gibi sitokinlerdir. Bu grupta yer alan sitokinler, sadece HIF-1 alfa protein ekspresyonunu değil aynı zamanda HIF-1'in DNA bağlanma aktivitesini de artırır. Normoksik ve hipoksik koşulda HIF-1 hedef gen ekspresyonu yaparlar [47].

HIF için dördüncü düzenleyici grup; karsinogenez kaynaklı ROS ürünü, Cr(VI), *vanadate*, anjiotensin ve TNF-alfa gibi sitokinlerdir. Bazı çalışmalar hipoksi altında mitokondriden salınan ROS'un arttığını ve HIF-1 aktivitesi için gerekli olduğu hipotezini destekler [60, 69]. ROS karsinogenezde önemli rol üstlenir. Cr (VI) kompleksi HIF-1 alfa aktivasyonu ve ROS stabilizasyonuna neden olur. HIF-1 alfa'da karsinogenezde rol almaktadır [70].

2.7. HIF-1 alfa ve *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

2.7.1. Anjiogenez ve Tümör Prognoz

HIF-1, hem VEGF hem de VEGFR düzenlemesinde anahtar rol oynar. İnsan tümör hücre biyopsisi, immün histokimyasal analizi birçok kanser türünde HIF-1 alfa *over* ekspresyonu olduğunu göstermiştir [71]. Ayrıca VEGF ekspresyonu ve vaskülarizasyon ilişkisi de gösterilmiştir [72, 73]. HIF-1 alfa'yı gösteren bir ajanla işaretlenen kolon kanseri hücrelerinde VEGF ekspresyonu ve anjiogenez artmıştır [74, 75]. HIF-1 alfa, varlığı ve yokluğunun tümör büyümesi ve anjiogenez ile pozitif veya negatif ilişkisi vardır [72, 76, 77]. Tümörlerdeki VEGF *over* ekspresyonu, yüksek vaskülarite, lenf nodu metastazı, karaciğer metastaz artışı ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Birçok raporda VEGF artışı, insan meme kanserinde tümör içi mikro damar yoğunluğunun anjiogenez için bağımsız belirleyici olduğu göstermiştir [78-81].

Over kanseri ilgili çalışmada, HIF-1 alfa tümörde apoptoz ilişkili bulunmuştur. Ayrıca HIF-1 alfa tarafından hedeflenen pek çok proteinin, tümör hücre proliferasyonu, adhezyonu ve sağ kalımda rol aldığı gözlemlenmiştir. HIF-1 alfa

over ekspresyonu, tümör süpresör gen mutasyonu veya eksikliğinin kombinasyonu birçok insan kanserinde gözlenir. Bu değişiklikler tümör büyümesi, invazyon ve metastazla ilişkilidir. Klinik olarak yüksek HIF-1 alfa ekspresyonu, lenf nodu negatif meme kanserinde genel sağ kalım, hastaliksız sağ kalım azalmasında anlamlı bulunmuştur. Erken evre serviks kanseri ve lenf nodu negatif meme kanseri olgularında artmış mortalite ile ilişkilidir [72, 82-84]. HIF-1 alfa *over* ekspresyonu, nazofarenks yassı hücre kanserinde tedavi başarısızlığı ve mortalite artışı ile ilişkilidir. *Her- 2/neu* aktivitesi, VEGF ekspresyonu ve Ki- 67 ekspresyonu lenf nodu negatif meme kanserinde kötü prognozu işaret eder. Bu kanıtların tümü bir tümörde hipoksi varlığının kötü prognozu işaret ettiğini gösterir [83, 85, 86]. Ayrıca mesane, kolon, glial, hepatosellüler, pankreatik, ovaryan, prostat, meme, renal tümörlerle yapılan birçok çalışmada, HIF-1 alfa ve HIF-2 alfa seviyesinde artış izlenmiştir. Klinik serilerde baş boyun, nazofarenks, kolorektal, pankreatik, meme, serviks, osteosarkom, endometrial, ovaryan, mesane, glioblastom ve gastrik karsinomlarda HIF-1 alfa ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bulunmuştur [87, 88].

Tümörde en iyi tanımlanmış HIF aktivasyon mekanizması hipoksidir. Düşük O₂ konsantrasyonu, artmış metabolik aktivite ve/veya tümör hücrelerinin lokal kapiller kan kaynaklarına uzaklığı ile ilişkili olabilir. HIF proteini tümörde perinekrotik alanda izlenmiştir. HIF'ın O₂ sinyal yolunda genetik bozukluk olan normoksik tümörde de aktivite artışı olabilir [71, 89]. VHL, HIF'ın transkripsiyonel aktivasyonunda önemli rol oynar. VHL inaktivasyonu, HIF stabilizasyonuna neden olur. Birçok çalışma PI-3K sinyal yolunun, HIF'ı aktive ettiğini göstermiştir. Mazure ve arkadaşları PI-3K inaktivasyonunun VEGF'ü inhibe ettiğini belirtmiştir [90-92]. HIF, tümör gelişiminin anahtar basamakları olan anjiogenez, metabolizma, proliferasyon, metastaz ve diferensiyasyonda rol oynar [93]. Tümör progresyonu için neovaskülarizasyon kritiktir, tümör hücrelerinin anjiogenezi tetikleme kabiliyeti çok basamaklı süreçtir. Hem HIF-1 alfa hemde HIF-2 alfa, VEGF ekspresyonuna sebep olmaktadır, ancak bu etki hücre tipine göre değişmektedir yani hücre bağımlıdır [94].

2.7.2. Metabolizma

Yetmiş yıl önce, kanser hücrelerinin glikoz metabolizmasını oksidatif iken glikolitik yollara kaydırduğu gösterilmiştir. Bu süreç *Warburg* etkisi olarak bilinir[43]. HIF-1'in glikolitik metabolizmada birçok gen ekspresyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Daha önceki çalışmalarda HIF-1'in mitokondrial solunumu kontrol ederek de hücre metabolizmasını düzenlediği gösterilmiştir. Zhang ve arkadaşları VHL yoksun RCC (*Renal Cell Cancer*) hücrelerinde, HIF-1 alfa'nın mitokondrial kitleyi negatif etkilediğini gözlemlemiştir. Bu etkiyi c-Myc aktivitesinin inhibisyonuna bağlamışlardır. Bu bilgiler HIF'in metabolizmanın pek çok basamağında önemli bir mediatör olarak görev yaptığını göstermektedir [95].

2.7.3. Proliferasyon

HIF tümör büyümesinde önemli rol oynar. VHL yoksun RCC hücrelerinde tümör büyümesi için HIF-2 hem gerekli hem de yeterlidir. RCC hücrelerinden kaynaklanan ve HIF-2 *over* ekspresyonu yapan tümörler, HIF-1 *over* ekspresyon yapanlardan daha hızlı büyürler [94, 96, 97]. Covello ve ark. ES'den (*Embryonic Stem Cell*) kaynaklanan, HIF-1 alfa yerine HIF-2 alfa bulunan teratomların daha geniş ve proliferasyon hızlarının daha fazla olduğunu bulmuşlardır [98]. HIF'in hücre proliferasyon kontrol mekanizmalarından birisi c-Myc aktivitesinin modülasyonudur [99, 100]. HIF, ayrıca siklin D₁ aktivasyonu aracılığı ile hücre siklus progresyonunda yer alabilir. Siklin D₁ birçok kanserde artış gösteren hücre düzenleyicisi proteindir. Daha önceki çalışmalar RCC hücrelerindeki tümör büyümesi ve HIF aracılı siklin D₁ ekspresyonu arasında ilişki olduğunu göstermiştir [94, 101].

2.7.4. Metastaz

Metastaz tümör patogenezinde kritik basamaktır. Kanserden ölümün birincil nedenidir. Metastaz, tümör hücre invazyonu, intravazasyon, ekstrasvazasyon ve

proliferasyon gibi basamaklardan oluşur. HIF birçok tümörde metastaz ile ilişkilidir. Metastazın anahtar faktörleri olan, *E-cadherin*, LOX (*Lishil Oxidase*), CXCR4 (*Chemocine Receptor 4*), SDF-1'i (*Stromal Derivated Factor-1*) etkileyerek metastazı artırır.

E-cadherin epitelyal kanserlerde metastatik potansiyelin anahtar faktördür. Hücre-hücre adhezyonunu sağlayan moleküldür ve *anti-growth* faktörleri uyarır. *E-cadherin* inhibisyonu metastatik potansiyeli artırır. *E-cadherin* zorlu ekspresyonu kanser hücresinde metastazı inhibe eder. HIF, over kanseri ve VHL yoksun RCC hücrelerinde *E-cadherin* ekspresyonunu düzenler. HIF'in, *E-cadherin* özel baskılayıcılar üzerinden (*snail-sip1*) *E-cadherin* ekspresyonunu engellediği düşünülmektedir [93, 102-104]. HIF ayrıca ekstra sellüler matriks proteini LOX'un aktivasyonu ile metastaza etki eder. LOX artışı meme, baş boyun kanserli hastalarda artmış uzak metastaz, azalmış hastaliksız sağ kalım ve genel sağ kalım ile ilişkilidir. Hipoksik tümör hücrelerinde LOX'un genetik ve farmakolojik inhibisyonunun *invitro* ve *invivo* olarak hipoksi ile uyarılan hücrede invazyon ve metastazı önlemede yeterli olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular LOX'un hipoksi ile metastazda kritik bir faktör olduğunu gösterir [105].

CXCR4 ve SDF-1 arasındaki bağlantı, metastatik tümör hücrelerinin migrasyonunda önemli rol oynar. CXCR4 tümörde en sık ekprese edilen kemokindir. SDF-1'de metastaz bölgelerinde (akciğer-karaciğer-kemik iliği) yüksek oranda ekprese edilir. Çalışmalar HIF'in hem CXCR4 hem de SDF-1 için güçlü uyarıcı olduğunu, VHL yoksun RCC, küçük hücre dışı akciğer kanseri ve glioblastom endotel hücrelerinde göstermişlerdir [106, 107].

2.7.5. Diferensiyasyon

Kanser kök hücreleri, tümör büyümesinin önemli mediatörüdür. Kanser kök hücre hipotezine göre, tümörler kendi kendine yenilenen ve heterojen popülasyona diferensiyasyon olma yeteneğine sahip küçük bir popülasyondan kaynaklanırlar. Hipoksi ve HIF'in birçok hücre tipinde, diferensiyasyon olmayan durumu artırdığı bilinmektedir.

Hipoksinin kanser hücrelerinin dediferansiyasyonunu da artırdığı gözlemlenmiştir [108-110].

HIF-1 alfa, *Notch* (transmembran sinyal yolağı) ICD bölgesini stabilize eder. *Notch* düzenlenmesinin yanı sıra, HIF kök hücredeki gen ekspresyonunu direkt etkileyerek diferansiye olmayan durumu artırabilir. hES'deki (*hypoxic Embryo Stem Cell*) dediferansiye durumun varlığı Oct 4 ekspresyonu ile ilişkilidir. Oct 4 fibroblastların yeniden programlanması ve ES morfolojisi, büyümesi için gerekli olan 4 transkripsiyon faktöründen biri olarak tanımlanmıştır. Pamar, Lee ve Covello HIF-2'nin insan hipoksik RCC hücrelerinde Oct 4 ekspresyonunu direkt etkilediğini göstermiştir [111-113].

2.7.6. HIF ve Tümör İlişkisi

HIF'in protümörojenik özelliği yanında, ayrıca tümör büyümesini inhibe ettiği de rapor edilmiştir. Carmeliet, Acker ve Mack HIF-1 eksik tümör hücrelerinde daha büyük tümörler oluştuğunu, glioblastom ve VHL yoksun fibrosarkomlarda HIF aktivasyonunun tümör büyümesini inhibe ettiğini gözlemlediler [114-116]. Son çalışmalar HIF-1'in tümör büyümesini negatif olarak regüle edebileceğini gösterdi. İlk olarak HIF-1, hücre siklus arrestini Myc aktivitesini inhibe ederek uyarabilir. HIF-1 alfa ve Myc arasındaki fiziksel iletişim siklin kinaz inhibitör P₂₁'in Myc aracılı baskılanmasını engeller. İkinci olarak HIF direkt veya indirekt mekanizmalar ile apoptozu indükleyebilir [117]. HIF-1'in birçok insan kanser hücresinde, makrofajlarda ve endotel hücrelerde proapoptotik genler olarak bilinen BNIP-3 ve NIX ekspresyonunu direkt olarak indüklediği gösterilmiştir. Hipoksizde BNIP-3 aracılı hücre ölüm mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Yapılan bir çalışmada BNIP-3'ün hipoksi aracılı makrofaji için gerekli olduğu gösterilmiştir. Otofajinin genel olarak bir hücre sel sağ kalım mekanizması olduğu düşünülür ancak otofajik hücre ölümüne de neden olabilir [118-120]. Biju ve arkadaşları düşük glukoz varlığında, HIF-1'in renal epitel hücrelerinde hipoksi nedeniyle hücre ölümünü artırdığını göstermişlerdir. Glukoz deposu yetersiz olan hücrelerde HIF-1 aracılı glikolizin, hipoksi ile uyarılan apoptozda bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir [121].

2.8. HIF ve Radyoterapi

Radyoterapi kanserde etkili tedavi yöntemidir. Radyoterapinin hedefinde tümör ile birlikte, tümör damarlarında vardır [43]. Radyasyona tümör damar duyarlılığının radyoterapiye genel yanıtta majör belirleyici olduğu Garcia-Barros ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür [122]. Bu ilişki radyoterapinin direkt hücre ölümüne neden olmasına ilaveten tümörü besleyen damarlarda hasar oluşturarak ikincil yoldan hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Tümörler yaşamları için damara ihtiyaç duyduklarından az miktarda damar yıkımı, büyük tümör hücre ölümüne neden olabilir. Tümör damar endoteline, radyoterapi etkisini maksimize etmek güçlü bir tedavi stratejisi olabilir [123-125]. Tümör damarlanmasının radyoterapiye yanıt çalışması, Gorski ve arkadaşları tarafından da yapılmıştır. Radyoterapinin VEGF ekspresyonu üzerine etkisini araştırmışlar. Sonuçta radyoterapinin VEGF salınımını artırdığını, VEGF'ün de endotel hücrelerini radyasyona dirençli hale getirdiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışma, tümör damar yapısının radyasyona karşı nasıl aktif olarak korunduğunu göstermiştir [126]. Bu çalışmaya dayanarak bir çok çalışma antianjiogenik ajanlarla radyoterapi kombinasyonunun EC (*Endothelial Cell*) radyasyon duyarlılığını maksimize etmekteki etkisini, *xenograft* ve glioblastom tümörlerinde kullanarak araştırdı [127-130].

Tümör EC radyasyon direncini artıran kompleks mekanizma başlangıçta az etkili düşünüldü. Şimdi VEGF'den farklı birçok faktörün bulunduğu gözlemlendi. Sonuç olarak tümör damarlarının radyasyon duyarlılığında, EC tirozin kinaz reseptörlerinin inhibisyonunun tek başına VEGF reseptör blokajından daha etkili olduğu bulundu [131]. Şu anda radyoterapinin tümör endotel hücrelerini nasıl bir mekanizma ile korumak için indüklediği konusu az bilinmektedir. VEGF sekresyonu bu yolun önemli bir parçasıdır, ancak ilave sitokinlerde olmalıdır. Bu tanıma uyan faktör HIF-1 dir. HIF-1 hipoksi ile düzenlenen, alfa ve O₂ bağımsız beta subünitinden oluşan bir heterodimerdir. HIF-1 kompleksi çekirdekteki HRE_S'e (*Hypoxia Regulator Elementary*) bağlanarak tümör metabolizmasını, büyümesini ve anjiogenezde rol alan 40'dan fazla genin ekspresyonunu uyarmaktadır [132].

HIF-1 tarafından uyarılan VEGF dışındaki EPO (*Erythropoietin*), TGF-beta, PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) ve transferinde, anjiogeneze yüksek aktiviteye sahiptir [133-136]. VEGF, hücreleri biyoaktif bFGF salması için uyarmaktadır. VEGF ve bFGF, EC'nin radyasyon direncini artırmaktadır [126, 137]. Sonuç olarak radyoterapi sonrası tümör damar ilişkisinde HIF-1'in, tek başına VEGF'den daha etkili olduğu söylenebilir [42].

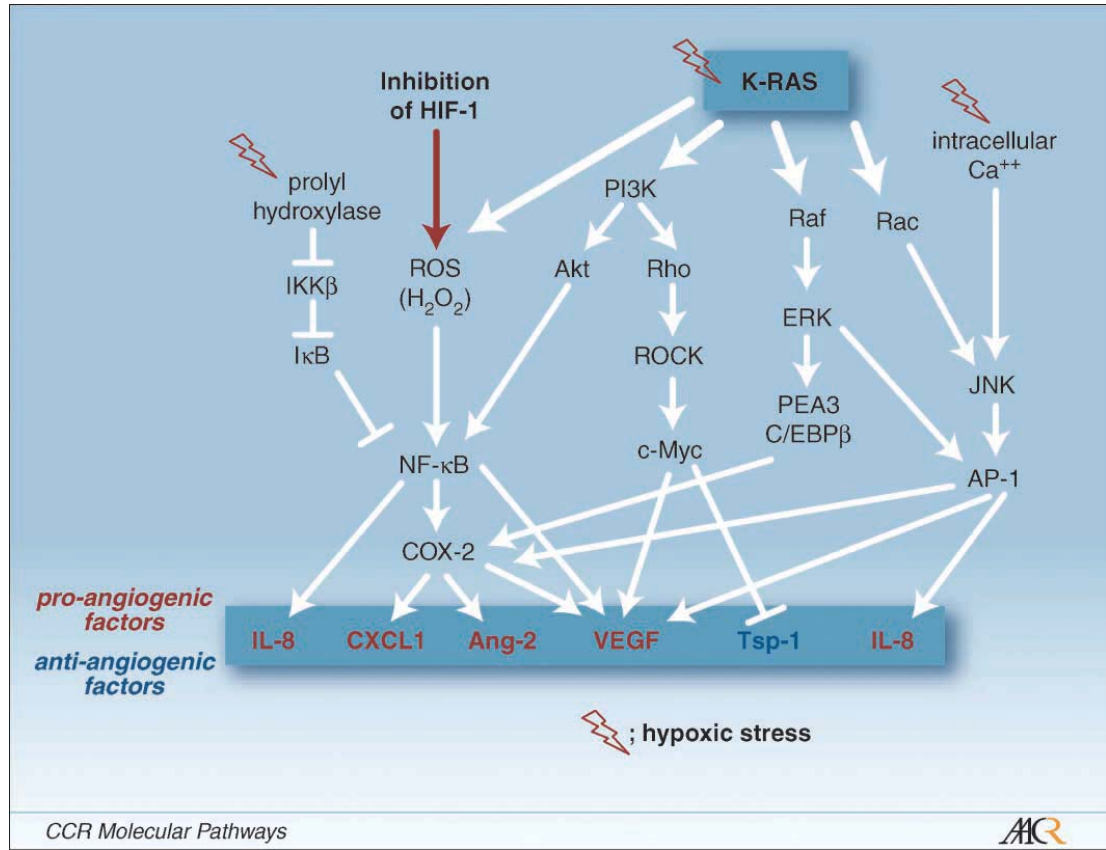
2.9. Tümör Anjiogenezinde HIF'den Bağımsız Yollar

İnsan kanserlerinde anjiogeneze ayırt edici özellik olup, VEGF uyarılması tümör anjiogenezinin esansiyel parçasıdır. Bu olaylar, birçok genetik ve çevresel etkileşim ile oluşmaktadır [138]. Onkojenik mutasyonlar da tümör gelişmesinde son derece önemlidir ve düzenli olarak VEGF stimüle ederler. Hipoksi bu döngüyü artırıcı etkiye sahiptir. Hipoksik koşullarda HIF-1, VEGF'in birinci düzenleyicisidir [45, 139]. Oksijen azlığında prolin hidroksilaz etkisiyle oluşan, prolin kalıntıları üzerinden, HIF-1 alfa hidroksile olur. *Ubiquitin*, proteozom yolağında yer alan VHL proteinine bağlanır. Hipoksik durumda prolin hidroksilaz inaktiftir bu HIF-1 alfa stabil durumu ile sonuçlanır [62].

Embriyogenik kök hücrelerden elde edilen HIF-1 alfa eksik fare *xenograft* çalışmalarında, VEGF ve damar düzeyinde anlamlı azalma görülmüştür. Bu sonuçlar, anjiogeneze de HIF-1 alfa'nın anahtar rolünü işaret etmektedir [140]. Ancak HIF-1 eksik tümör *xenograft*'larda anjiogeneze devam etmiştir. HIF-1'in insan tümörlerindeki yerini göstermek amacıyla *invivo xenograft* çalışmalar yapılmıştır. HIF-1 alfa'nın küçük RNA parçalarına ayrılması, kolon kanseri *xenograft*'larında tümör büyümesini azaltmış ancak, anjiogeneze durmamıştır [141]. Ayrıca mikro damar perfüzyonu HIF-1 eksik tümörlerde değişmemiştir. Şaşırtıcı olan HIF-1 eksik *xenograft* dokuda veya invitro HIF-1 eksik hücrelerde VEGF uyarılması ortadan kalkmamıştır. VEGF düzeyi % 50 azalmış, fakat VEGF üretilmiştir. HIF-1 alfa'dan bağımsız çalışmalar, HIF-1 alfa yıkımında da anjiogenezin devam ettiğini, mikro damar yoğunluğu ölçerek göstermiştir. VEGF, mRNA düzeyinde % 50 düşüş olmasına rağmen, VEGF protein düzeyinde anlamlı değişiklik olmamıştır. VEGF'ün

persistan sentezi, anjiogenik fenotipi açıklamakla beraber, HIF-1 eksik tümörlerde ek bir anjiogenik faktör, IL-8'in (*Interleukine-8*) indüklendiği görülmüştür. IL-8 nötralizan faktörler (antikorlar) verildiğinde, fareler de mikro damar yoğunluğu ve damar çapında anlamlı azalma olmuştur. Bu IL-8'in anjiogenezde düzenleyici rolünü göstermiştir. IL-8 bloklandığı zaman damar bütünlüğü nadiren sağlanmıştır. Bulgular HIF-1'in anjiogenez için tek düzenleyici faktör olmadığını göstermektedir [3, 142].

HIF-1 bağımsız, VEGF düzenlenmesinde yer alan moleküler yollar araştırılmış ve RAS onkogeninin de önemli rol oynadığı görülmüştür. (Şekil 2.9.1.)



Şekil 2.9.1. Hipoksi Bağımsız Yol [3].

İlk olarak HIF-1 alfa eksik farelerden, H-RAS alınıp embriyonik fibroblastlara gönderilmiş. Tümörlerde anjiogenez devam etmiştir. HIF azalmasına rağmen, anjiogenezin devamında H-RAS'ın *in vivo* anjiogenezini kompanse ettiği görülmüştür. HIF-1 alfa yokluğunda glukoz-transporter-1 ve fosfo gliserat kinaz (hipoksi yanıt genleri) yok olmuş ancak VEGF indüksiyonu devam etmiştir [143]. Hipoksidede

VEGF'ün, RAS ilişkili düzenlenmesiyle ilgili birçok mekanizma öne sürülmüştür. Onkojenik k-RAS ve hipoksi, VEGF'ü sinerjik olarak *up*-regüle ederler. Hipoksi RAS ile ilgili birçok yolu aktive eder (Ekstra sellüler sinyal düzenleyici kinaz, C-jun, NH₂ kinaz, P₃₈, Akt ve Rho). Bunların içinden ekstra sellüler sinyal düzenleyici kinaz ve Akt kolon kanserinde hipoksi ile aktive olur. Akt, PI-3K'nın hedefidir. Fakat normoksik durumlarda, Akt inhibisyonu VEGF'ün hipoksik inhibisyonunu azaltmaz [144-147].

PI-3K'nın alternatif hedefi *Rho/Rho* kinaz yolu, VEGF'ün hipoksik indüksiyonu ile ilişkilidir [145]. Hipoksi ve onkojenik k-Ras sinerjik olarak PI-3K yoluyla GTP (*Guanosine Triphosphate*) varlığında *Rho* düzeyini artırır. Hipoksi ile *Rho* indüksiyonu endotel hücrelerde gösterilmiştir. Bu *Rho*'nun hipoksik stresdeki rolünü işaret eder. VEGF'ün hipoksi ve K-Ras ile *up*-regülasyonu, *Rho* kinaz ve PI-3K'nın inhibisyonu ile zayıflar [145, 148].

PI-3K / *Rho* / *Rho* kinaz tarafından uyarılan *cis* – düzenleyici element tanımlanmıştır. Bu yol *c-Myc* onkogenin de birleşir [145]. HIF-1 yokluğunda, VEGF indüksiyonu için *c-Myc*'in (hipoksi ile indüklenen) fosforilasyonu gerekir. *c-Myc* eksik fare embriyolarında görülen geniş damar anomalileri, *c-Myc*'in anjiogenezde rolünü göstermektedir [149]. Bunlardan başka, anjiogenik anahtarın IL-1 beta yolu ve *c-Myc* indüksiyonu ile düzenlendiği, pankreas beta hücre kanser modelinde de gösterilmiştir [150]. Hipoksi ve *c-Myc*, VEGF gen promotöründe ki *cis*– düzenleyici elementin aktivasyonu ile, VEGF düzenlenmesi bağlantılıdır. Bunun yanında PI-3K / *Rho* / *Rho* kinaz / *Myc* yolağı, eşzamanlı olarak, endojen bir anti-anjiogenik olan TSP-1'i *down*-regüle eder [145, 151]

Hipoksik yanıtta yer alan diğer transkripsiyon faktörü NF-kB'dır (*Nuclear Factor-kappa Beta*). NF-kB'nın hipoksi ile aktivasyon mekanizması net değildir. Mitokondirideki ROS varlığına göre, hipoksik hücrelerdeki redoks potansiyeli değişimi, NF-kB aktivasyonu ile sonuçlanabilir. Buna ek olarak NF-kB aktivasyonu, azalan pirolil hidroksilasyonu ve IKB kinaz –beta ile ilişkili olabilir. Sonuç olarak NF-kB, PI-3K aktivasyonu yoluyla onkojenik RAS tarafından aktive olabilir [152-

154]. Önceki bir çalışma, NF-kB' nin, VEGF transkripsiyonunu düzenlediğini açıkça göstermişti. Ayrıca NF-kB, diğer transkripsiyon faktörleri üzerinden VEGF'ü indirekt olarak da düzenliyor olabilir. NF-kB bağımlı düzenlemede, AP-1'in esansiyel rolü tariflenmiştir. HIF-1 bağımlı olmayan en az iki tane AP-1 parçası vardır. Bununla beraber NF-kB ve HIF arasında kompleks bir bağ vardır. Örnek olarak, hücreler IL-1 beta lipopolisakkarid ve ROS tarafından sitimüle edildiğinde NF-kB, HIF-1'i indükleyebilir. Bu bize NF-kB' nin HIF-1 bağımlı ve bağımsız mekanizmalar ile VEGF' ü uyardığını göstermektedir. NF-kB' nin daha önemli bir rolü belki de anjiyojenik faktör, IL-8' i uyarması olabilir [141].

2.10. VEGF'den Başka Anjiyojenik Faktörlerin, HIF-1 Bağımsız Aktivasyonu

VEGF, tümörlerde indüklenen birincil anjiyojenik faktörlerden biri olmasına rağmen, HIF-1 aktivitesine bağlı olmayan önemli başka faktörlerde vardır. Mesela H-RAS, PI-3K, Akt, NF-kB ve Raf, hücre dışı sinyal ilişkili kinaz, AP-1 yoluyla IL-8'i indükleyebilir [155-157]. Cox-2'de (*Cyclooxygenase-2*) başka anjiogenez anahtar mediatördür. Hem RAS hem de hipoksi ile indüklenebilir. Hipoksik koşullarda HIF-1, Cox-2 indüksiyonunda önemli rol oynasa da, hipoksi NF-kB yolu ile HIF-1 bağımsız şekilde Cox-2'yi *up*-regüle eder. Cox-2 proanjiyojenik etkisini PGE₂'yi (*Prostaglandin E₂*) indükleyerek gösterir. PGE₂, HIF-1 üzerinden sinyal gönderse de mitojen aktive eden protein kinaz ve PI-3K/Akt'yi aktive edebilir ki, bunlarda potansiyel olarak VEGF indükleyicidir. Ayrıca PGE₂, anjiyojenik olan diğer moleküllerden Ang-2 ve CXCL-1 gibi molekülleri de indükleyerek anjiogenez başlatabilir [157].

2.11. Radyasyon, Reoksijenasyon, HIF-1 alfa, Stres Granülü, Damar Direnci

Hücrelerin hayatta kalabilmesi için değişen koşullara adaptasyon çok önemlidir. Ökaryotik hücre çevrede meydana gelen farklı sinyallere göre metabolizmasını ayarlayarak anabolik enerjisini korur. Yapılan çalışmalar, mRNA (*messengerRNA*) metabolizmasının, hücre yaşamının devamında kontrol

noktalarından biri olduğunu göstermektedir. DNA hasarları, kromozom anormallikleri, onkogen aktivasyonu, ısı, radyasyon, bakteriyel viral infeksiyonlar, çeşitli mutasyonlar, hipoksi gibi etmenler stres granüllerinin oluşumunu etkileyebilir. Bu granüller mRNA' nın yaklaşık yarısını kapsayan sitozolik polimerlerdir. mRNA' nın translasyonu ve bozunumu ile ilgili görevleri olan çok yaygın sitoplazmik RNA yapılarıdır. Sitoplazmik RNA granülleri; germ hücrelerinde (germinal granül), somatik hücrelerde (stres granülü), nöronlarda (nöronal granül) gen ekspresyonunun *post* transkripsiyonel düzenlemesinde önemli rol oynarlar [158, 159].

Hücre metabolizmasında enerjinin gereksiz harcanmaması için anabolik, katabolik yolların düzen içinde çalışması ve her basamakta kontrol edilmesi gereklidir. Çevresel koşullardaki ani değişiklikler hücre için stres kaynağıdır. Radyasyon, ısı şoku, ozmotik şok, metaller, oksidatif stres, düşük pH, glukoz eksikliği, ksenobiyotikler, iskemi, bakteriyel viral infeksiyonlar hücre için hayati önemi olan stresler arasındadır. Çevresel ve genetik faktörler canlının yaşam süresini belirler. Hücrelerin, stres ile karşılaştıklarında bazı proteinlerin sentezine son verip, karşılaştıkları stres ile mücadele edebilecekleri proteinleri sentezlemeye başladıkları bilinmektedir. Stres ile savaş yeni proteinlerin sentezlenmesi, mRNA metabolizmasının yeniden programlanmasıyla başlar. Translasyonun ertelenmesi veya sonlandırılmasında mRNA metabolizmasının yeniden programlanmasında birçok protein rol oynar. Stres altındaki hücrelerde mRNA' ların RNA granülü haline çevrilmesi ile protein translasyonu ertelenir. Bu RNA granülleri stres granülü olarak isimlendirilir. Stres granülleri, eğer stres hücre için ölümcül değil ise geri dönüşümlüdür. Stres ortadan kalktığında protein translasyonu başlar. Ancak stres uzun süreli ve ölümcül ise oluşan stres granülleri geri dönüşümsüzdür ve sonuç hücrenin ölümüdür [159].

Strese cevap olarak, ökaryotik hücre mRNA' sını, strese bağlı hasarın tamirinde hücre metabolizmasını değiştirebilir. Bu değişimde, ortama uyum sağlamada eIF2-alfa ve stres granülü ilişkili RNA bağlayan protein olan TIA-1 görev almaktadır. Diğer RNA granüllerinin aksine stres granülleri normal şartlarda görülmezler, ancak çevresel strese cevap olarak 15–30 dakika içinde hızla ortaya çıkarlar. Stres granülü

oluşumu için eIF2–alfa'nın stres aktive eden kinazlar tarafından fosforile edilmesi en kritik noktadır. Fosforilasyon sonrası eIF2–alfa–GTP–tRNA^{met} üçlü kompleksinin oluşumu eIF2–alfa fosforilasyonunu azaltır. Böylece translasyon başlaması ve polizom (ribozomların protein sentezi için bir araya gelmesi) oluşumu bloke olur. Stres granülü oluşumu için fosforile edilmiş eIF2–alfa gereklidir. TIA-1 proteinleride özellikle fosfo eIF2–alfa'nın azaldığı durumlarda stres granülü oluşumunda önemli role sahiptir. Stres etkisi ile toplanan TIA-1 proteinlerinin düzenlenmesi glutaminden zengin prionlar vasıtasıyla olur. Stres granülleri, strese maruz kalmış hayvan hücrelerinde apopitozdan birkaç saat önce ortaya çıkmaktadır. Mangiardi ve arkadaşları ototoksik bir ilaç olan gentamisini uyguladıkları tavukların kohlea hücrelerinde apopitozdan birkaç saat önce stres granüllerini tesbit etmişlerdir. Radyasyon tümör hücrelerini etkilemeden stres granülü bağlantılarını etkileyebilir. Radyasyon ile indüklenen HIF-1 alfa'nın düzenlediği transkriptler, stres granülü bağlantılarının kopması ile iyileşme sırasında sekteye uğrar. Bu transkriptlerin stres granülü içine hapsolması ile inhibe olduğu düşünülmektedir. Benzer sonuçlar iskemik hayvan modellerinde de gözlenmiştir. Stres granülünün iskemi veya hipoksi sırasında nöronlarda ki protein translasyonunu da düzenleyebileceği tanımlanmıştır. Bu durum stres granülünün invitro hücre kültür eseri olmadığı, organizmanın strese yanıtta integral parça olduğu görülmektedir [158].

Hipoksi tehlikesi altındaki hücre TIA ile işaretlendiğinde 4 saatlik bekleme süresinden sonra stres granülleri görülür. Reoksijenasyon sonrası bu granüller kayıp olabilir. Reoksijenasyon, stres granülü depolimerizasyonu ile HIF-1 sinyal salınımı ve HIF-1 ile düzenlenen transkriptlerin translasyonunu artırır. TIA ile işaretlenmiş hipoksik tümör çevresinde stres granülünün bulunduğu, ancak ışınlanmamış tümörlerde stres granülü yoğunluğu az olabilir. Bu radyasyon ve reoksijenasyonun, stres granülü depolimerizasyonun da öncülük ettiğini göstermektedir. Stres granülleri hipoksik gen translasyonu düzenlenmesinde de rol oynar. İnhibisyonları radyasyon aracılı reoksijenasyon ile tersine çevrilebilir [42]. Radyasyon, HIF-1 tarafından kısmen düzenlenen VEGF ve bFGF salınımını artırır. Bu faktörlerin radyasyon bağımlı salınımının, HIF-1 veya başka bir mekanizma tarafından düzenlendiğini bilmek önemlidir. Eğer HIF-1 bu salınım tarafından düzenleniyor ise radyasyonla

uyarılan HIF-1 *up* regülasyonu ile aynı paternde olması gerekir. Fakat böyle değil ise patern çok farklı olmalıdır. VEGF ve bFGF ile işaretlenen tümörlerde, HIF-1 aktivitesi ile VEGF ve bFGF *up* regülasyonu söz konusudur. Bu bulgu radyasyon ile uyarılan HIF-1'in, radyasyon sonrası VEGF ve bFGF salınımında ne kadar önemli olduğunu gösterir. VEGF ve bFGF artışı HIF-1'in tümör damarlarında radyasyon direncini artırdığını göstermektedir. Radyoterapiye bağlı tümör reoksijenasyonu ile HIF-1 aktivitesinde ki artış, endotel hücreleri için radyo koruyucu olan sitokinlerin yüksek HIF-1 aktivitesi ile salındığını gösterir. HIF-1 çekirdek sinyali, HIF-1 sinyal yolunda ki son nokta değildir. Hipoksi esnasında HIF-1 bağımlı transkriptler parsiyel olarak stres granüllerine sekestre olurlar. Bu olay HIF-1 sinyalinde düşüşe neden olur. Reoksijenasyon sonucu, hücre sekestre edilmiş HIF-1 bağımlı transkriptlerin translasyonunu yapar. Hücre hipoksik şoktan kurtulur. Bu olay hipoksi sonrası stres granüllerinin hipoksi bağımlı gen translasyonunu daha iyi yaptığını gösterir. Bilinmeyen hipoksi sırasında stres granüllerinden ne kadar HIF-1 bağımlı transkriptin çıkarıldığı veya eklendiğidir. Stres granülleri de özel transkriptler çıkartmaktadır [42].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanan sağlıklı, erkek cinsiyette, yetişkin, 30- 40 gr ağırlığında *Swiss Albino* cinsi 24 adet fare denek olarak kullanıldı. Fareler 25 derece oda ısısında, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık dönemler şeklinde ayarlanmış ortamda, serbest su ve gıda sağlanarak, stres ve gürültüden izole edilerek çalışmaya alındı. Çalışma sırasında hayvanların bakımı Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarında yapıldı.

3.1. Radyasyon Uygulaması

Fareler bir kontrol grubu olmak üzere 6'şar hayvandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki 6 fare hariç, diğer 3 grubdaki 18 fareye aynı günde pelvis bölgesine, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalında bulunan Co- 60, 780- C cihazı ile 5x23 cm alan boyutu, SSD 80 cm, 10.7 dakika sürede, Dmax'a 1000 cGy doz, tek fraksiyonda iyonize radyasyon uygulandı. Uygulama öncesi sedasyon sağlamak için 45- 50 mg/kg doz, kas içine ketamin injeksiyonu uygulandı. Alan içinde 5 adet fare prone pozisyonda fiske edildi. (Şekil 3.1.1)



Şekil 3.1.1. Resim Radyasyon Alanı

3.2. Deney Hayvan Grupları

Birinci grupta yer alan (kontrol) 6 fare hiçbir işleme maruz kalmadan birinci günde, Ketamin 45- 50 mg/kg İM injeksiyon ile sedasyon sağlandıktan sonra, kalp içinden kan alımı yöntemiyle ötanazi uygulandı. Ötanazi sonrasında pelvis bölgesi açılıp mesane organı tamamı çıkarıldı.

İkinci grupta yer alan 6 adet farenin pelvis bölgesine tek fraksiyon 1000 cGy iyonize radyasyon uygulamasından 24 saat sonra, Ketamin 45-50 mg/kg İM injeksiyon ile sedasyon sağlandıktan sonra, kalp içinden kan alımı yöntemiyle ötanazi uygulandı. Ötanazi sonrasında pelvis bölgesi açılarak mesane organı tamamı çıkarıldı.

Üçüncü grupta yer alan 6 hayvanın pelvis bölgesine tek fraksiyonda 1000 cGy iyonize radyasyon uygulamasından 48 saat sonra Ketamin 45-50 mg/kg İM injeksiyon ile sedasyon sağlandıktan sonra kalp içinden kan alımı yöntemiyle ötanazi uygulandı. Ötanazi sonrasında pelvis bölgesi açılarak mesane organı tamamı çıkarıldı.

Dördüncü grupta yer alan 6 farenin pelvis bölgesine tek fraksiyonda 1000 cGy iyonize radyasyon uygulamasından 7 gün (168 saat) sonra Ketamin 45-50 mg /kg İM injeksiyon ile sedasyon sağlandıktan sonra kalp içinden kan alımı yöntemiyle ötanazi uygulandı. Ötanazi sonrasında pelvis bölgesi açılarak mesane organı tamamı çıkarıldı.

Tüm örnekler önce % 10 formol içeren sıvı içinde yıkandıktan sonra ağzı vida kapaklı ve içinde % 10 formol bulunan örnek kapları içine her hayvan için ayrı kutu kullanılarak yerleştirildi.

3.3. İmmün Histokimyasal Değerlendirme

Uygulama sonrasında alınan doku örnekleri, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embryoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, rutin ışık mikroskopi

parafin doku yöntemi takip edilerek parafine gömüldü. Beş mikrometrelik kesitler, HIF-1 alfa, VEGF, TIA-1, eIF2, TSP-1 primer antikorları kullanılarak indirekt immün histokimya yöntemi ile değerlendirildi.

Kontrol ve deney grubunda, mesane dokusunda bulunan vasküler endotel hücreleri immün histokimyasal yöntemle karşılaştırıldı. İyonize radyasyonun 24, 48 ve 7. günde anjiyogenez yolunda yer alan HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1 ve TSP-1 düzeylerini ne şekilde değiştirdiği ışık mikroskopu altında her parametre için gruplara göre değerlendirildi ve skorlandı.

3.3.1 Histokimyasal Skorun (*Hscore*) Hesaplanması

Her bir preparat boyanma derecelerine göre yoğunluğu 1 (zayıf), 2 (orta), 3 (kuvvetli) olarak değerlendirildi. Her alanda boyanan hücre sayısı % olarak belirlendi ve elde edilen değerler aşağıdaki formüle yerleştirilerek, her olgunun histokimyasal skoru (*Hscore*) elde edildi.

$$Hscore = \sum P_i (i + 1) \quad \text{İ} = \text{Boyanma yoğunluğu}$$

$$P_i = \text{Boyanmış hücre sayısı (\% 0- \% 100)}$$

3.3.2 Işık Mikroskopisi Gereç ve Yöntemi Parafin Takibi

- 1- Fiksasyon; 24- 48 saat % 10 formalin
- 2- 24 saat akarsuda yıkama
- 3- % 60 etil alkol 30 dakika
- 4- % 70 etil alkol 30 dakika
- 5- % 80 etil alkol 30 dakika
- 6- %95 etil alkol 30 dakika
- 7- % 100 etil alkol I ' de 60 dakika
- 8- % 100 etil alkol II' de 60 dakika
- 9- Ksilen- alkol'de 30 dakika
- 10- Ksilen I 'de 50 dakika
- 11- Ksilen II'de 50 dakika

- 12- Ksilen- parafinde 30 dakika
- 13- 60 C⁰ lik etüvde erimiş parafinde 60 dakika
- 14- Parafin I' de 60 dakika
- 15- Parafin II' de 60 dakika

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek blok haline getirildi. Işık mikroskopunda incelemek üzere hazırlanan parafin bloklardan 5 mikrometrelik seri kesitler alındı. Preparatların ilk bölümü hemotoksilen eozin ile boyandı, seri kesitlerin diğerlerine immünohistokimya boyaması yapıldı.

3.3.3 Hemotoksilen Eozin Protokolü

- 1- Deparafinizasyon 60 C⁰ etüvde 1 saat veya 1 gece
- 2- Ksilen I 30 dakika
- 3- Ksilen II 30 dakika
- 4- % 95 alkol 2 dakika
- 5- % 80 alkol 2 dakika
- 6- % 70 alkol 2 dakika
- 7- % 60 alkol 2 dakika
- 8- Musluk suyu 5 dakika
- 9- Hematoksilen 1 dakika
- 10- Musluk suyu 5 dakika
- 11- Asit – alkol 5- 10 saniye
- 12- Musluk suyu 5 dakika
- 13- Eosin 1 dakika
- 14- Musluk suyu ile yıkama 5 dakika
- 15- % 95 alkol 2 dakika
- 16- % 80 alkol 2 dakika
- 17- Lamaların kurutulması hava veya etüvde
- 18- Ksilen 60 dakika
- 19- Kapatma

3.3.4 İndirekt İmmün Histokimya Yöntemi

Kullanılan malzemeler; Ksilen, alkol, PBS (fosfat buffer solüsyonu), sitrat buffer, dakopen, % 3 hidrojen peroksit ve primer antikorlardır (HIF-1 alfa, VEGF, TIA-1, eIF2, TSP-1).

- 1- Deparafinizasyon: 60 C⁰ etüvde gece boyunca
- 2- Ksilen I 30 dakika
- 3- Ksilen II 30 dakika
- 4- % 95 alkol 2 dakika
- 5- % 80 alkol 2 dakika
- 6- % 70 alkol 2 dakika
- 7- % 60 alkol 2 dakika
- 8- Distile su 10- 15 dakika
- 9- Dokular immünhistokimya setine alınır
- 10- Dakopen kalemi ile dokuların etrafı çizilir
- 11- PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama
- 12- Sitrat buffer 360 C⁰ 5 dakika
- 13- PBS ile 3 kez 5 dakika yıka
- 14- Hidrojen peroksit ile 5 dakika yıkama
- 15- PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama
- 16- Bloking 1 saat
- 17- Primer antikoru tüm gece veya 2 saat buzdolabında beklet
- 18- PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkama
- 19- Biotin ile 30 dakika
- 20- PBS ile 3 kez, 5 dakika yıka
- 21- Streptoavadin ile 30 dakika
- 22- PBS ile 3 kez, 5 dakika yıka
- 23- Peroksit substrat (DAB veya AEC) ile 5- 10 dakika,(hazırlanışı;147 ml
DAB dilüsyon buffer / 3 ml DAB substrat)
- 24- PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkama
- 25- Distile su ile 10 -15 dakika yıkama

- 26- Mayers hematoksilen
- 27- Distile su
- 28- % 80 lik alkol
- 29- % 90 lık alkol
- 30- Ksilen ile 30 dakika
- 31- Kapatma işlemleri uygulandı.

3.4 İstatistik Analiz

Verilerin analizi *SPSS version 15. 0 for Windows* istatistik paket programında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan değişkenlerin, verilerin normal dağılıma uygunluğu için ‘*Shapiro – Wilk* ‘ testi uygulandı ve bu testteki P değerleri (anlamlı) >0.05 olduğundan verilerin dağılımının normal olduğu sonucuna varıldı.

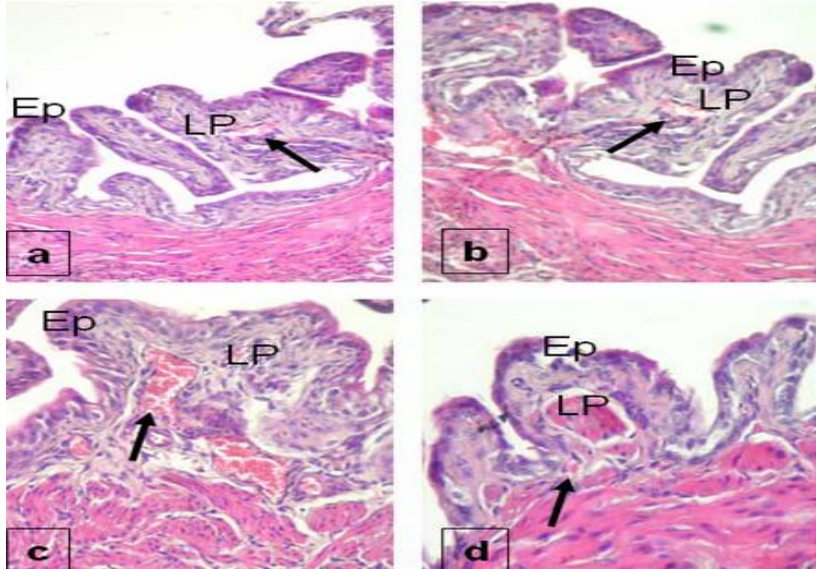
Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında alt grup sayısı 2‘den fazla olduğundan, tek yönlü varyans analizi (*One Way ANOVA*) uygulandı. Varyans analizi testi ile gruplar arasındaki fark anlamlı bulundu. *ANOVA* testinde önemli bulunan grupların ikili karşılaştırmaları yapılarak, varyansların homojen (varyansların eşit) olduğu grupların ikili karşılaştırmalarında *TUKEY* testi, homojen olmayan grupların karşılaştırmalarında ise *TAMHANE* testi kullanıldı. Yapılan istatistik değerlendirmelerinde güven düzeyi % 95 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mesane İmmün Histokimyasal Bulgular

Mesane örneklerinin histokimyasal teknik kullanılarak hematoksilin-eozin ile boyanmış preparatlarının incelenmesinde, 1.grupta (kontrol) mesane lümeninin katlantılı ve değişikçi epitelle örtülü, epitel kalınlığının genellikle 5-6 kat olduğu gözlemlendi. Epitel altında bulunan lamina propriyanın kollegen liflerden oluştuğu izlendi. Kollegen lifler düzensiz dağılım gösteriyordu. Lamina propriya içinde çok sayıda kan damarı, ayrıca bağ doku hücreleri olan fibroblastlar yaygın olarak gözlemlendi. Lamina propriya altında içte ve dışta longitudinal, ortada ise sirküler düzenlenmiş kas lifleri gözlemlendi.

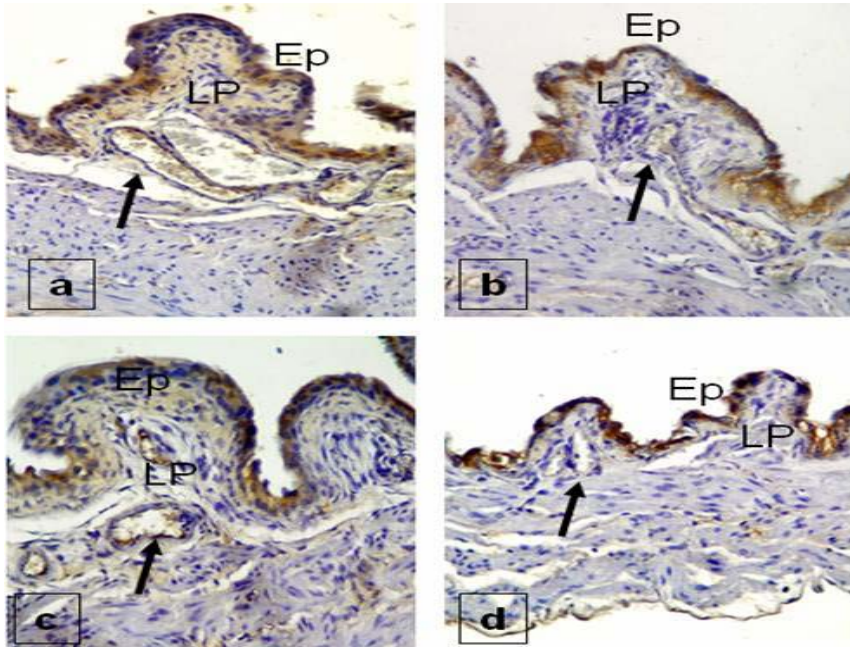
Deney grupları mesane doku örneklerinde de epitelin değişikçi epitelle örtülü olduğu ve altında lamina propriyanın uzandığı gözlemlendi. Grup 1'den (kontrol) (a) farklı olarak özellikle Grup 2 (b) ve Grup 3 (c) de hafif ödem izlendi. (Şekil 4.1.1.)



Şekil 4.1.1. Resim Mesane Hematoksilin-Eozin
Grup 1(a), Grup 2(b), Grup 3(c), Grup 4 (d)

Resim(mesane HE): Grup 1 (Kontrol) (a), Grup 2 (b), Grup 3 (c), Grup 4 (d) ait mesane örneklerinin HE (hematoksilen-eozin) ile boyanmış preparatlarında, lümenin değişici epitel (Ep) örtülü olduğu görülmektedir. Epitel altında uzanan lamina priada (LP) çok sayıda kan damarı (ok) bulunmaktadır. Orijinal büyütme X 200

Doku örneklerinin immun histokimyasal teknik kullanılarak yapılan incelemesinde VEGF antikoru ile boyanmış preparatlarda Grup 1(kontrol) (a) ve Grup 4(d) VEGF antikoru ile oldukça zayıf boyanması ilgi çekici bulundu. Grup 3 (c) nin oldukça kuvvetli boyandığı, Grup 2(b) ise orta derecede boyandığı gözlemlendi. (Şekil 4.1.2.)



Şekil 4.1.2. Resim Mesane VEGF

Resim (mesane VEGF): VEGF antikoru ile boyanmış Grup 1 (Kontrol) (a), Grup2 (b), Grup 3 (c) ve Grup 4 (d) ait mesane örneklerinde, LP da bulunan kan damarları (ok) Grup 4 (d) ve Grup 1 (a) oldukça zayıf boyanırken Grup 2 (b) orta derecede immunoreaktivite gösterdiği gözlenmektedir. VEGF immunoreaktivitesi Grup 3 (c) de yüksek derecede boyanma görülmektedir. Ep (epitel). Orijinal büyütme X 200

VEGF değişkeni için yapılan varyansların homojenliği test sonucuna göre; göre gruplararası varyans homojen bulunmuş ($p= 0. 099$; $p>0,05$) ve TUKEY testi uygulanmıştır.

Tablo 4.1.1. Çoklu Karşılaştırma VEGF

| Bağımlı Değişken | (I) GRUP | (J) GRUP | Ortalama Farkı (I-J) | Std. Hata | Sig. (anlamlılık (p)) | 95% Güven Aralığı | | |
|------------------|-----------|----------|----------------------|------------|-----------------------|-------------------|-----------|--------|
| | | | | | | Alt Limit | st Limit | |
| VEGF | Tukey HSD | 1 | 2 | -8,600(*) | 2,546 | 0,009 | -15,46 | -1,74 |
| | | | 3 | -27,600(*) | 2,546 | 0,000 | -34,46 | -20,74 |
| | | | 4 | 4,1 | 2,546 | 0,386 | -2,76 | 10,96 |
| | | 2 | 1 | 8,600(*) | 2,546 | 0,009 | 1,74 | 15,46 |
| | | | 3 | -19,000(*) | 2,546 | 0,000 | -25,86 | -12,14 |
| | | | 4 | 12,700(*) | 2,546 | 0,000 | 5,84 | 19,56 |
| | | 3 | 1 | 27,600(*) | 2,546 | 0,000 | 20,74 | 34,46 |
| | | | 2 | 19,000(*) | 2,546 | 0,000 | 12,14 | 25,86 |
| | | | 4 | 31,700(*) | 2,546 | 0,000 | 24,84 | 38,56 |
| | | 4 | 1 | -4,1 | 2,546 | 0,386 | -10,96 | 2,76 |
| | | | 2 | -12,700(*) | 2,546 | 0,000 | -19,56 | -5,84 |
| | | | 3 | -31,700(*) | 2,546 | 0,000 | -38,56 | -24,84 |

* : Ortalama farkı 0.05 seviyede anlamlıdır.

VEGF Tukey HSD oklu karşılaştırma testine göre;

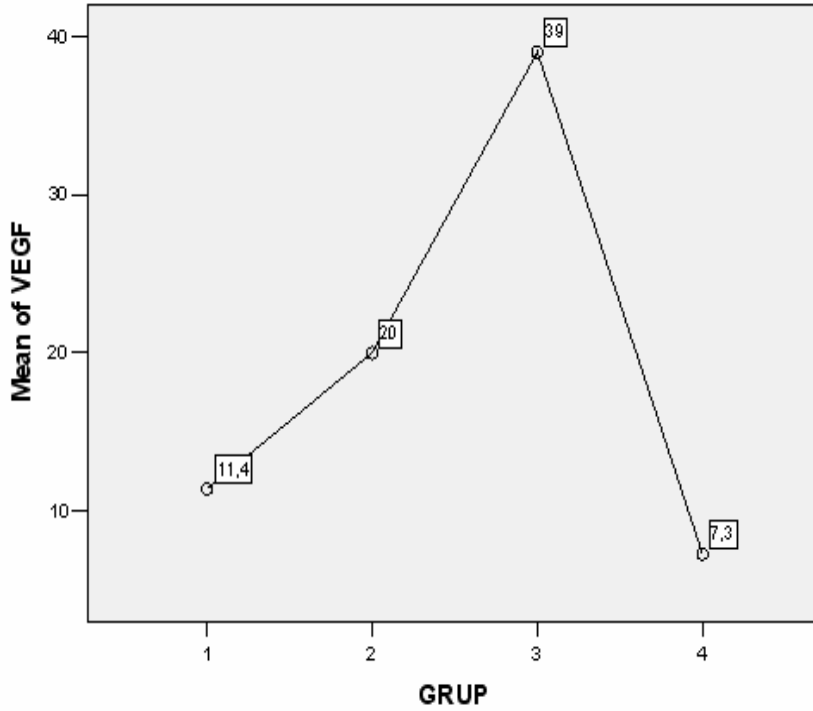
Kontrol grubu (Grup 1), Grup 2 ve Grup 3 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (p değeri sırasıyla 0. 009 ve 0,000; $p<0,05$). Ancak Grup 4 ile Kontrol Grubu (Grup 1) arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p değeri 0. 386).

Grup 2 ile Kontrol grubu (Grup 1), Grup 3 ve Grup 4 arasında anlamlı fark grlmştir (p değeri sırasıyla 0,009, 0,000 ve 0,000).

Grup 3 ile Kontrol grubu (Grup 1), Grup 2.ve Grup 4.arasında anlamlı fark görülmüştür (p değeri sırasıyla 0,000, 0,000 ve 0,000).

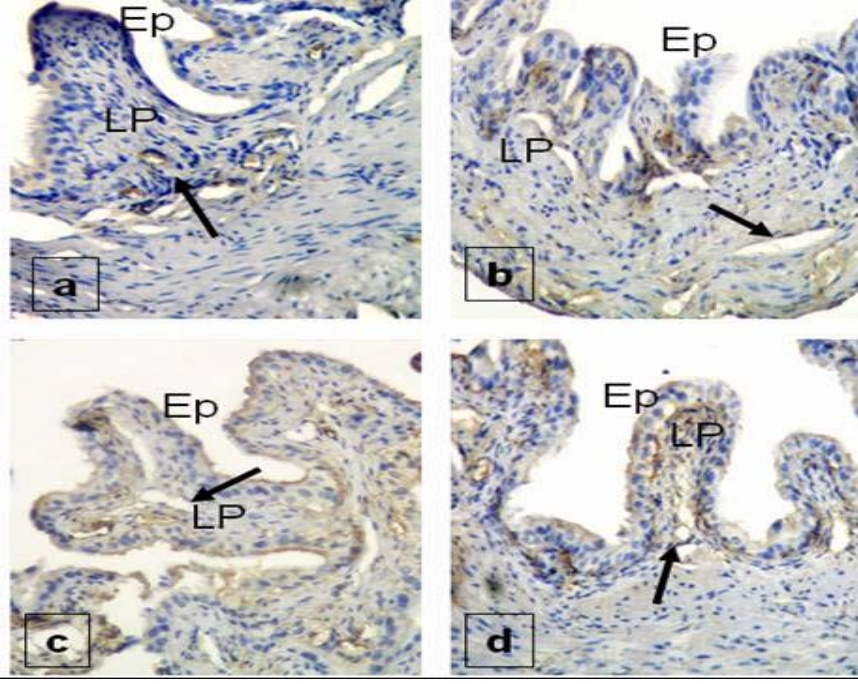
Grup 4 ile Kontrol grubu (Grup 1) arasında anlamlı fark olmamasına karşın Grup 4 ile Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir p değeri sırasıyla 0,386, 0,000 ve 0,000.

VEGF grupların ortalama değerleri şekil 4.1.3. de verilmiştir.



Şekil 4.1.3. VEGF Grupların Ortalama Değerleri

Grup 1(Kontrol) (a) ve Grup 4 (d) ün eIF2 antikoru ile boyanmasında damar duvarlarında oldukça kuvvetli boyanma gözlemlendi. Grup 2 (b) ve Grup 3 (c) de ise boyanma şiddeti orta derecede ve yaklaşık benzer özellik gösteriyordu. (Şekil 4.1.4.)



Şekil 4.1.4. Resim Mesane eIF2

Resim mesane eIF2: eIF2 antikoruna ile boyanmış, Grup 1 (kontrol) (a), Grup 2 (b), Grup 3 (c) ve Grup 4 (d) ait mesane örneklerinde, LP da bulunan kan damarlarının (ok). Grup 1 (kontrol) (a), Grup 4 (d) grubunda yüksek derecede, Grup 2 (b), Grup 3 (c) ise düşük biçimde boyandığı görülmektedir. Epitel (Ep). Orijinal büyütme X 200

Test istatistiklerinin sonuçları Tablo 4.1.2. de verilmiştir.

Tablo 4.1.2. Çoklu Karşılaştırma eIF2

| Bağımlı Değişken | (I) GRUP | (J) GRUP | Ortalama Farkı (I-J) | Std. Hata | Sig. (anlamlılık (p)) | 95% Güven Aralığı | |
|------------------|----------|----------|----------------------|-----------|-----------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | | Alt Limit | Üst Limit |
| eIf_2 Tamhane | 1 | 2 | 28,000(*) | 4,19 | 0,000 | 15,08 | 40,92 |
| | | 3 | 24,400(*) | 5,33 | 0,001 | 8,66 | 40,14 |
| | | 4 | -4,6 | 7,163 | 0,989 | -26,29 | 17,09 |
| | 2 | 1 | -28,000(*) | 4,19 | 0,000 | -40,92 | -15,08 |
| | | 3 | -3,6 | 4,227 | 0,958 | -16,65 | 9,45 |
| | | 4 | -32,600(*) | 6,386 | 0,002 | -53,14 | -12,06 |
| | 3 | 1 | -24,400(*) | 5,33 | 0,001 | -40,14 | -8,66 |
| | | 2 | 3,6 | 4,227 | 0,958 | -9,45 | 16,65 |
| | | 4 | -29,000(*) | 7,185 | 0,006 | -50,73 | -7,27 |
| | 4 | 1 | 4,6 | 7,163 | 0,989 | -17,09 | 26,29 |
| | | 2 | 32,600(*) | 6,386 | 0,002 | 12,06 | 53,14 |
| | | 3 | 29,000(*) | 7,185 | 0,006 | 7,27 | 50,73 |

* : Ortalama farkı 0.05 seviyede anlamlıdır.

eIF2 Tamhane çoklu karşılaştırma testine göre;

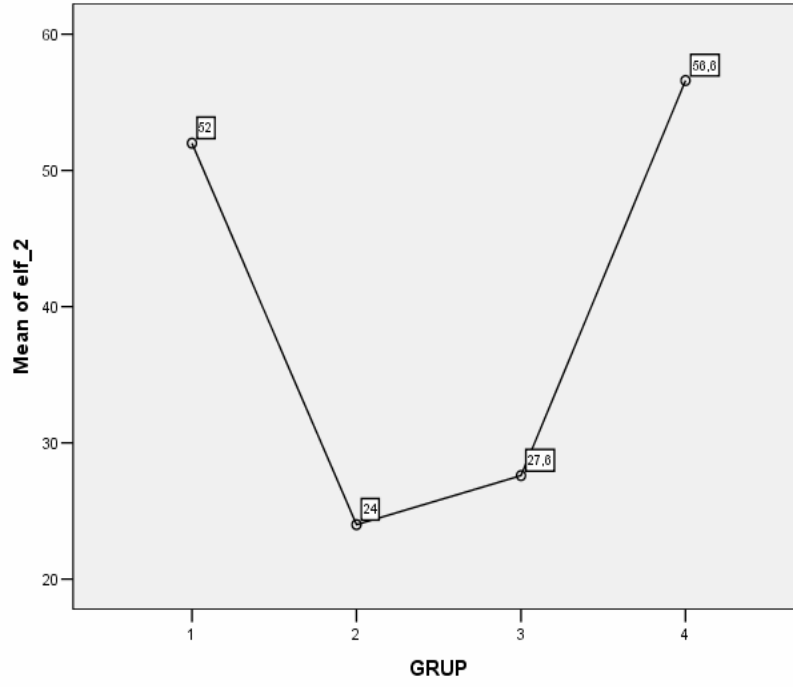
Kontrol grubu (Grup 1) ile Grup 2 ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür (p değeri sırasıyla 0.000 ve 0.001). Grup 4 ile Kontrol Grubu (Grup 1) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p = 0.989).

Grup 2 ile Kontrol grubu (Grup 1) ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlam farkı oluşmuş p değeri sırasıyla (0.000 ve 0.002), Grup 2 ile Grup 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ortaya çıkmıştır (p = 0.958).

Grup 3 ile Kontrol grubu (Grup 1) ve Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür (p değeri sırası ile 0.001 ve 0.006). Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p = 0.958).

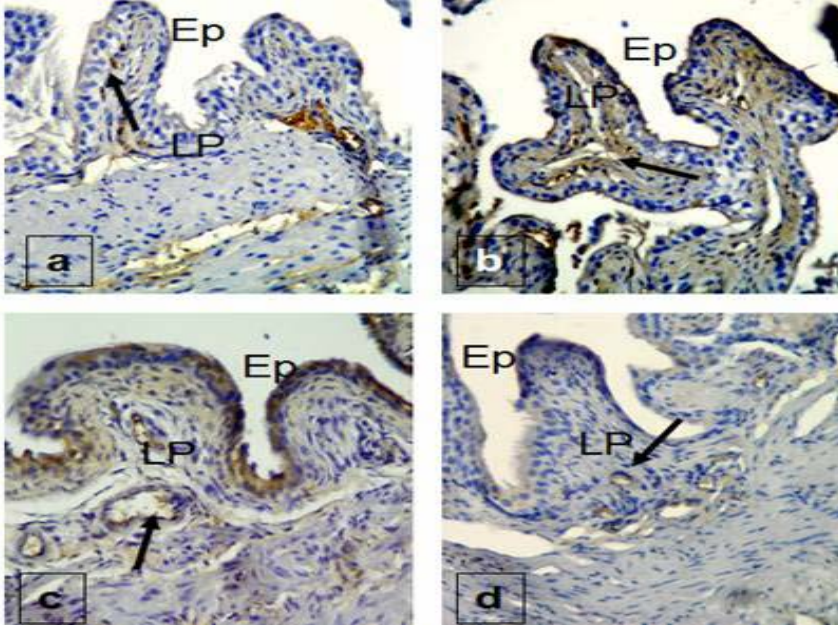
Grup 4 ile 2. ve 3. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiş p değerleri sırası ile 0.002 ve 0.006 olmuştur. Grup 4 ile Kontrol Grubu (Grup 1) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir (p değeri 0.989).

eIF2 grupların ortalama değerleri Şekil 4.1.5. de verilmiştir.



Şekil 4.1.5. eIF2 Grupların Ortalama Değerleri

HIF-1 alfa antikoru ile boyanmış Grup 3 (c) nin preparatlarında kuvvetli boyanma gözlenirken, diğer grupların boyanma şiddeti Grup 3 (c) den belirgin derecede az olması dikkati çekti. (Şekil 4.1.6.)



Şekil 4.1.6. Resim Mesane HIF-1

Resim mesane HIF-1 alfa: HIF-1 alfa antikoru ile boyanmış, Grup 1(kontrol) (a), Grup 2 (b), Grup 3 (c) ve Grup 4 (d) ait mesane örneklerinde, LP da bulunan kan damarlarının (ok). Grup 1 (kontrol) (a), Grup 2 (b) ve Grup 4 (d) grupların da zayıf derecede, Grup 3 (c) ise orta derecede boyandığı görülmektedir. Epitel (Ep). Orijinal büyütme X 200

HIF-1'in istatistik sonuçları Tablo 4.1.3. de verilmiştir.

Tablo 4.1.3. Çoklu Karşılaştırma HIF-1

| Bağımlı Değişken | | (I) GRUP | (J) GRUP | Ortalama Farkı (I-J) | Std. Hata | Sig. (anamlılık (p)) | 95% Güven Aralığı | |
|------------------|-----------|----------|----------|----------------------|-----------|----------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | | | Alt Limit | Üst Limit |
| HIF-1 | Tukey HSD | 1 | 2 | -9,9 | 5,261 | 0,253 | -24,05 | 4,25 |
| | | | 3 | -28,245(*) | 5,14 | 0,000 | -42,07 | -14,42 |
| | | | 4 | 2,6 | 5,261 | 0,960 | -11,55 | 16,75 |
| | | 2 | 1 | 9,9 | 5,261 | 0,253 | -4,25 | 24,05 |
| | | | 3 | -18,345(*) | 5,14 | 0,005 | -32,17 | -4,52 |
| | | | 4 | 12,5 | 5,261 | 0,100 | -1,65 | 26,65 |
| | | 3 | 1 | 28,245(*) | 5,14 | 0,000 | 14,42 | 42,07 |
| | | | 2 | 18,345(*) | 5,14 | 0,005 | 4,52 | 32,17 |
| | | | 4 | 30,845(*) | 5,14 | 0,000 | 17,02 | 44,67 |
| | | 4 | 1 | -2,6 | 5,261 | 0,960 | -16,75 | 11,55 |
| | | | 2 | -12,5 | 5,261 | 0,100 | -26,65 | 1,65 |
| | | | 3 | -30,845(*) | 5,14 | 0,000 | -44,67 | -17,02 |

* : Ortalama farkı 0.05 seviyede anlamlıdır.

HIF-1 Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre;

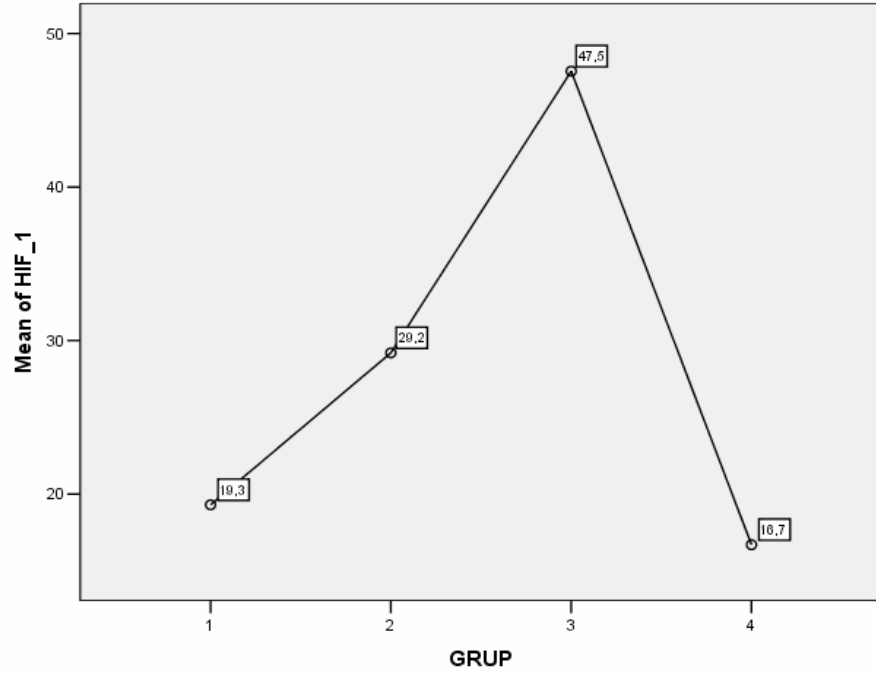
Kontrol grubu (Grup 1) 3. gruptan istatistiksel olarak anlamlı farklı olmasına karşın ($p = 0.000$), 2. ve 4. gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p değeri sırası ile 0.253 ve 0.960).

Grup 2, 3. gruptan anlamlı farklı ($p = 0.005$) fakat Grup 1(kontrol) ve Grup 4 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir (p değerleri sırasıyla 0.253 ve 0.1).

Grup 3 istatistiksel olarak Kontrol Grubu (Grup 1), 2.grup ve 4.gruptan anlamlı farklı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.000, 0.005 ve 0.000).

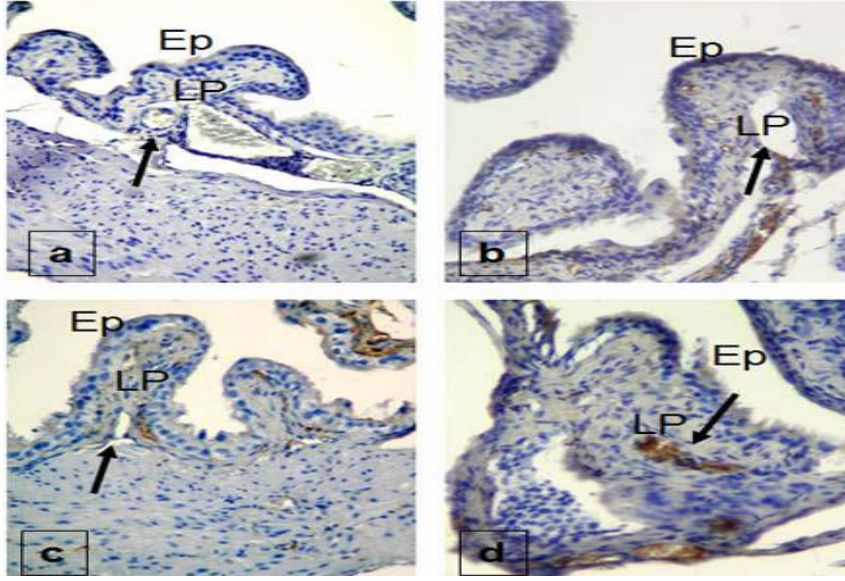
Grup 4, Grup 3'den anlamlı farklıdır (p değeri 0.000). Grup 4 ile Kontrol grubu (Grup 1) ve Grup 2 arasında anlamlı fark yoktur (p değerleri sırasıyla 0.960 ve 0.1).

HIF-1 alfa grupların ortalama değerleri Şekil 4.1.7. de verilmiştir.



Şekil 4.1.7. HIF-1 Grupların Ortalama Değerleri

TIA-1 antikoru ile boyanmış doku örneklerinde, Grup 3 (c) de çok kuvvetli boyanma gözlenirken, Grup 2 (b) ve Grup 4 (d) de boyanma orta derecede gözlemlendi. TIA-1 antikoru ile boyanmış Grup 1 (a) (kontrol) grubu örneklerinde boyanma zayıf olarak gözlemlendi. (Şekil 4.1.8.)



Şekil 4.1.8. Resim Mesane TIA- 1

Resim mesane TIA-1: TIA-1 antikoru ile boyanmış, Grup 1(kontrol) (a), Grup 2 (b), Grup 3 (c) ve Grup 4 (d) ait mesane örneklerinde, LP da bulunan kan damarlarının (ok). Grup 1(kontrol) (a) grubunun zayıf derecede, Grup 2 (b) ve Grup 4 (d) nin orta derecede, Grup 3 (c) nin ise kuvvetli boyandığı görülmektedir. Epitel (Ep). Orijinal büyütme X 200

TIA-1'in istatistik sonuçları Tablo 4.1.4. de verilmiştir.

Tablo 4.1.4. Çoklu Karşılaştırma TIA-1

| Bağımlı Değişken | (I) GRUP | (J) GRUP | Ortalama Farkı (I-J) | Std. Hata | Sig. (anlamlılık (p)) | 95% Güven Aralığı | |
|------------------|----------|----------|----------------------|-----------|-----------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | | Alt Limit | Üst Limit |
| TIA-1 Tamhane | 1 | 2 | -17,500(*) | 3,64 | 0,003 | -29,01 | -5,99 |
| | | 3 | -31,636(*) | 2,033 | 0,000 | -37,61 | -25,66 |
| | | 4 | -12,100(*) | 3,164 | 0,013 | -21,95 | -2,25 |
| | 2 | 1 | 17,500(*) | 3,64 | 0,003 | 5,99 | 29,01 |
| | | 3 | -14,136(*) | 3,737 | 0,014 | -25,76 | -2,52 |
| | | 4 | 5,4 | 4,454 | 0,809 | -7,79 | 18,59 |
| | 3 | 1 | 31,636(*) | 2,033 | 0,000 | 25,66 | 37,61 |
| | | 2 | 14,136(*) | 3,737 | 0,014 | 2,52 | 25,76 |
| | | 4 | 19,536(*) | 3,274 | 0,000 | 9,52 | 29,56 |
| | 4 | 1 | 12,100(*) | 3,164 | 0,013 | 2,25 | 21,95 |
| | | 2 | -5,4 | 4,454 | 0,809 | -18,59 | 7,79 |
| | | 3 | -19,536(*) | 3,274 | 0,000 | -29,56 | -9,52 |

* : Ortalama farkı 0.05 seviyede anlamlıdır.

TIA-1 Tamhane çoklu karşılaştırma testine göre;

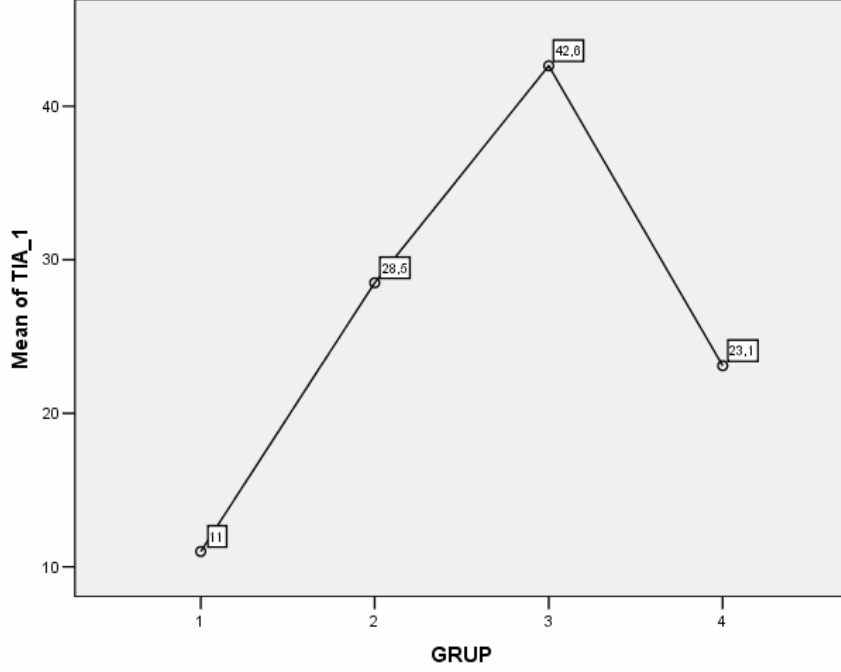
Kontrol Grubu (Grup 1), 2. 3. ve 4. gruptan anlamlı farklı bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.000, 0.000 ve 0.013).

Grup 2, Kontrol Grubu (Grup 1) ve 3. grup ile anlamlı farklıdır (p değerleri sırasıyla (0.003 ve 0.014). Grup 2 ile Grup 4 arasında anlamlı fark yoktur (p= 0.809).

Grup 3, 1, 2 ve 4. gruplar ile arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür (p değerleri sırası ile 0.000, 0.014 ve 0.000).

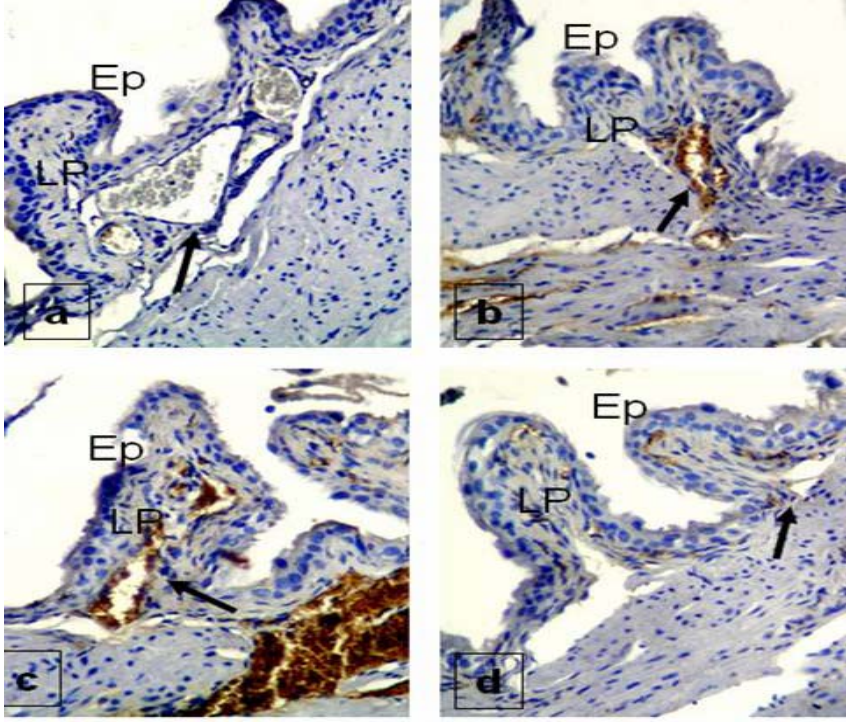
Grup 4, Kontrol grubu (Grup 1) ve Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklıdır (p değeri sırasıyla 0.013 ve 0.000). Ancak Grup 4 ile Grup 2 arasında istatistiksel anlamlı fark belirlenmemiştir (p = 0.809).

TIA-1 grupların ortalama değerleri Şekil 4.1.9. de verilmiştir.



Şekil 4.1.9. TIA-1 Grupların Ortalama Değerleri

TSP-1 ile boyanma Grup 1 (Kontrol) (a) örneklerinde oldukça kuvvetli gözlenirken, diğer grupların boyanma özellikleri oldukça düşük düzeyde gözlendi. (Şekil 4.1.10.)



Şekil 4.1.10. Resim Mesane TSP-1

Resim mesane TSP: Trombospondin antikoru ile boyanmış, Grup 1 (kontrol) (a), Grup 2 (b), Grup 3 (c), Grup 4 (d) ait mesane örneklerinde, LP da bulunan kan damarlarının (ok). Grup 1 (kontrol) (a) grubunda fazla boyanırken, Grup 2 (b), Grup 3 (c) ve Grup 4 (d) ise orta derecede boyandığı görülmektedir. Epitel (Ep). Orijinal büyütme X 200

TSP-1'in istatistik sonuçları Tablo 4.1.5. de verilmiştir.

Tablo 4.1.5. Çoklu Karşılaştırma TSP-1

| Bağımlı Değişken | (I) GRUP | (J) GRUP | Ortalama Farkı (I-J) | Std. Hata | Sig. (anamlılık (p)) | 95% Güven Aralığı | |
|------------------|----------|----------|----------------------|-----------|----------------------|-------------------|-----------|
| | | | | | | Alt Limit | Üst Limit |
| TSP-1 Tamhane | 1 | 2 | 56,518(*) | 7,148 | 0.000 | 35,45 | 77,59 |
| | | 3 | 58,818(*) | 5,95 | 0.000 | 40,17 | 77,47 |
| | | 4 | 45,618(*) | 7,556 | 0.000 | 23,44 | 67,8 |
| | 2 | 1 | -56,518(*) | 7,148 | 0.000 | -77,59 | -35,45 |
| | | 3 | 2,3 | 4,755 | 0,998 | -12,59 | 17,19 |
| | | 4 | -10,9 | 6,656 | 0,533 | -30,6 | 8,8 |
| | 3 | 1 | -58,818(*) | 5,95 | 0.000 | -77,47 | -40,17 |
| | | 2 | -2,3 | 4,755 | 0,998 | -17,19 | 12,59 |
| | | 4 | -13,2 | 5,348 | 0,169 | -30,16 | 3,76 |
| | 4 | 1 | -45,618(*) | 7,556 | 0.000 | -67,8 | -23,44 |
| | | 2 | 10,9 | 6,656 | 0,533 | -8,8 | 30,6 |
| | | 3 | 13,2 | 5,348 | 0,169 | -3,76 | 30,16 |

* : Ortalama farkı 0.05 seviyede anlamlıdır

TSP-1 Tamhane çoklu karşılaştırma testine göre;

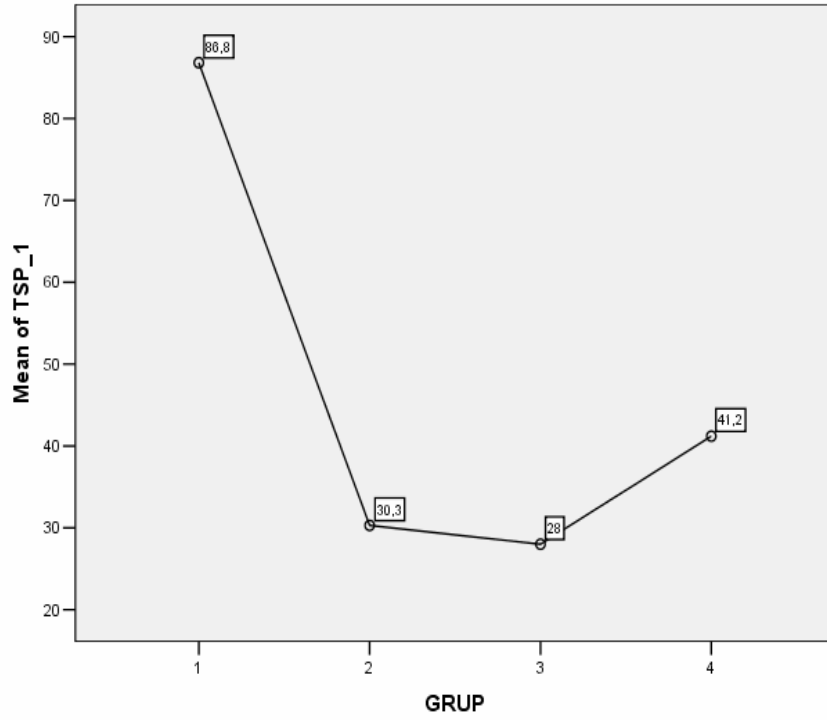
Kontrol grubu (Grup 1) ile 2. 3. ve 4. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.000, 0.000 ve 0.000).

Grup 2, kontrol grubundan (Grup 1) istatistiksel olarak anlamlı farklı olmasına karşın (p = 0.000), 3 ve 4. gruplar ile arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.998 ve 0.533).

Grup 3, Kontrol grubundan (Grup 1) istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmuştur (p= 0.000). Ancak Grup 3 ile 2 ve 4. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur (p değeri sırası ile 0.998 ve 0.169).

Grup 4, Kontrol grubu (Grup 1) ile istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğu belirlenmesine karşın (p = 0.000), 2. ve 3. gruplar ile arasında anlamlı fark görülmemiştir (p değeri sırasıyla 0.553 ve 0.169).

TSP-1 grupların ortalama değerleri Şekil 4.1.11. de verilmiştir.



Şekil 4.1.11. TSP-1 Grupların Ortalama Değerler

Grupların boyanma özellikleri tablo 4.1.6. da görülmektedir. Zayıf (+), Orta (++), Kuvvetli (++++), boyanma

Tablo 4.1.6. Grupların Boyanma Özellikleri

| | G1 | G2 | G3 | G4 |
|-------|------|----|------|------|
| VEGF | + | ++ | ++++ | + |
| eIF2 | ++++ | ++ | ++ | ++++ |
| HIF-1 | + | ++ | ++++ | + |
| TIA-1 | + | ++ | ++++ | ++ |
| TSP-1 | ++++ | + | + | + |

5. TARTIŞMA

Tümör hücrelerinin, radyasyona duyarlılığı tedavide önemlidir. Ancak tümör olmayan hücre hedeflerinde de radyoteröpatik yanıtı duyulan ilgi giderek artmaktadır. İskemik ve hipoksik stres patolojik ve fizyolojik anjiogenez için en önemli durumdur [42]. Vasküler endotel hücrelerin, hem normal, hem de tümörlü dokuda, radyoterapi yanıtı için kritik belirleyici olduğu gözlenmiştir. Primer hedeflerde endotel hücreye verilen radyasyon hasar derecesi tedaviye yanıtı anlamlı olarak etkileyebilir. Tümörde vasküler radyasyon duyarlılığını artırarak ve/veya normal dokuyu çevreleyen kısımda azaltarak, radyoterapinin tedavi edici penceresini genişletme olanağı sağlanabilir [4]. Tümör damarlanması, tümörün fenotip ve mikro çevresine bağlı olarak, normal doku vaskülaritesine göre farklıdır. Bu farklılıklar özel sinyal yollarını hedef alarak moleküler terapötikler geliştirmeye fırsat tanımaktadır. Tümör endotel hücrelerinin en önemli moleküler farkı, tümör kökenli sitokinlerle yakın ilişkide olmasıdır. Ancak bu sitokinler sağlam mikro çevre tarafından da salınabilir [16, 42, 160]. Tümör ve normal doku tarafından salınan VEGF ve benzer proteinler, endotel hücrenin tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak birçok anjiogenez yanıtı oluşturan sinyaller gönderebilir. Bu nedenle tümör endotel hücrelerinin radyasyon direnci, tümör kökenli sitokinlere bağlı olabilir. Bu sitokinleri hedef alarak selektif tümör damarlanması radyasyona duyarlı hale getirilebilir [4, 42, 160].

Folkman ve arkadaşlarının 1970'li yıllarda solid tümörlerle ilgili çalışmalara başladıkları literatürde görülmektedir. Tümör hücrelerinin veya dokusunun anjiogenez olmadan ancak 3- 4 mm çapa ulaşabildiğini göstermişlerdi. 1971-1972 yıllarında yapılan çalışmalarda solid tümör büyümesinin yeni damar oluşumu ile mümkün olabileceği kanaati vardı. Buna TAF (Tümör Anjiogenez Faktör) adı verilip, bu faktörün endotel hücrelerde mitojen aktiviteyi artıran bir faktör ile ortaya çıkabileceği düşünülmüştü. Bu nedenle kanser hücre büyümesinin anti anjiogenik ajanlarla tedavi edilebileceği görüşü benimsenmişti [161-163].

Radyoterapiye yanıtta tümör damarlanmasının duyarlılığının majör belirleyici olduğuda öne sürülmektedir [122]. Bu ilişki radyoterapinin direkt hücre ölümüne neden olmasına ilaveten, tümörün beslendiği damarlarda hasar meydana getirerek de ikincil hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir. Tümörler yaşamları için damarlarına ihtiyaç duyduklarından az miktarda damar yıkımı büyük miktarda tümör ölümüne neden olabilmektedir [123-125]. Radyasyona hassas tümörler iyi damar yapılarına sahipken, az damarlanmış tümörlerin radyasyona daha direnç gösterdiği bildirilmektedir ve radyasyonun tümör damar endoteline etkisini maksimize etmeye yönelik yeni ve güçlü tedavi stratejisi belirlemeye çalışan yayınlar bulunmaktadır [125]. Gorski ve arkadaşları tarafından bildirilen bir çalışmada tümör damarlanmasının radyoterapiye nasıl yanıt verdiği bakılarak radyoterapinin VEGF salınmasını artırdığı ve VEGF'ün endotel hücrelerini radyasyona dirençli hale getirdiği vurgulanmaktadır. Bu çalışma, tümörün kendi vasküler yapısını radyasyon hasarına karşı aktif olarak koruduğunu göstermektedir [126]. Bu çalışmaya dayalı diğer çalışmalarda da anti anjiogenik ajanlarla radyoterapi kombinasyonunun endotel hücrede radyasyon duyarlılığını artırmadaki etkisi araştırılmaktadır [127-130].

Normal doku ve solid tümörlerde hipoksi durumunda HIF-1 alfanın aktive olduğu bilinmektedir. HIF-1 alfa'nın hipoksida fizyolojik ve patolojik anjiogenez yolunun ana düzenleyicisi olduğu birçok çalışmada gösterilmektedir [164-167]. Radyasyon ile yapılan normal doku çalışmalarında HIF-1 artışı sonunda anjiogenez yolunun pozitif etkili faktörü VEGF düzeyinde de artış gözlemlenmektedir [164]. Organizma; stres veren radyasyon, ısı, hipoksi, iskemi, enfeksiyon gibi etmenlerle karşılaştığında, mRNA'nın yaklaşık yarısını kapsayan stres granüllerini aktive etmektedir. Bu granüller strese bağlı hasarın tamirinde hücre metabolizmasını değiştirmektedir. Değişimde ve ortama uyum sağlamada eIF2 ile TIA-1 görev almaktadır. Granüllerin oluşması, eIF2 fosforilasyonu ile eIF2 düzeyinin azalmasına neden olurken, stres veren faktörlerin etkisiyle TIA-1 düzeyini yükseltmektedir. Stres granülleri apoptozdan birkaç saat önce ortaya çıkabilmektedir. Stres granülü uyarılması için tümörlü dokuya ihtiyaç olmadan, çevre normal dokulardan da stres granül bağlantıları kurulabilmektedir [158, 159, 168]. Normal dokuda belli düzeyde bulunan, endojen olarak anjiogenez yolunda inhibitör

görev yapan faktör TSP-1 dir [3]. Normal doku çalışmalarında stres veren faktörlerin etkisi ile artan HIF-1 ve VEGF düzeyi, TSP-1'in *down* regülasyonuna, VEGF azalması ise TSP-1 düzeyinin *up* regülasyonuna neden olmaktadır. Bu durum VEGF aracılı negatif *feed-back* mekanizması ile açıklanmaktadır [164-167, 169].

1970'li yıllarda başlayan ve günümüze kadar devam eden çalışmalar tümörlü dokular üzerinde yapılmasına rağmen strese karşı verilen cevapta tümör hücrelerinin etkisi olmadan da çevre sağlam doku üzerinde de stres granülü etkilerinin gözlenmesi nedeniyle çalışmamızda sağlam fareler kullanılmıştır. *In-vitro* ortamda stres granülü oluşmaz, strese cevap *in-vivo* mikro çevre ile oluşabilir. Radyasyonun tümör olmayan hücreleri ve tümör etrafında mikro çevrede bulunan endotel hücreleri ve hatta sağlıklı dokudaki sessiz endotelide etkileyebileceği birçok yayında gösterilmektedir [42, 158, 170].

Çalışmamızda farelerin pelvis bölgesine, 10 Gy'lik dozun tek fraksiyonda uygulanması sonrasında, 1. grup (kontrol), 2. grup (24 saatte ötanazi), 3. grup (48 saatte ötanazi) ve 4. grup'un (7. günde ötanazi) normal mesane damar endotelinde anjiogenez yolunda yer alan faktörlerin immün histokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2010 yılında Rabbani ve arkadaşları sağlam ratların sağ hemitoraks bölgesine 8 Gy x 5 fraksiyon iyonize radyasyon uygulamışlar. Uygulama sonrasında, oksidatif stres ve doku hipoksisi, makrofaj toplanması ve inflamatuvar yanıtı paralel olarak 4. hafta sonunda akciğer dokusunda HIF-1 alfa seviyesinde yükselme tesbit etmişlerdir. Bu yükselişin hipoksiye bağlı olup olmadığını ise *pimanidazole* ile hipoksik bölgeleri tesbit ettikten sonra, hipoksik bölgede HIF-1 alfa yüksekliğini belirlemişlerdir. Dördüncü hafta sonrasında da HIF-1 alfa yükselişinin devamını gözlemlemişler, ayrıca TGF- beta, VEGF, NF-kB ve CD 105 seviyelerinin HIF-1 alfa yükselmesi sonrasında akciğer dokusunda arttığını belirtmişlerdir. VEGF ise radyasyon uygulaması sonrasında 6. haftada anlamlı olarak yükselmiş ve 10. haftaya kadar devam etmiştir. Radyasyon uygulaması sonrasında 22. haftada kapiller proliferasyon indekisinde yükselmiştir [164].

Aslında günümüzde de radyoterapinin tümör endotel hücrelerini korumak için VEGF'ü nasıl uyardığı çok az bilinmektedir. VEGF salınmasının bu yolağın önemli bir parçası olduğunu ancak ilave sitokinlerinde olması gerekliliği savunulmaktadır. Sonuçta tümör damarlarının radyasyona direncinde, endotel hücre tirozin kinaz reseptör inhibisyonunun tek başına VEGF reseptör blokajına göre daha etkili olduğu saptanmıştır [42].

Tümörlü ve sağlam damar endotel çalışmalarında olduğu gibi bu çalışmada da radyasyon uygulaması sonrası anjiogenez yolunda görev yapan VEGF'de artış gözlemlendi. Çalışmamızda VEGF'ün immün histokimyasal değerlendirmesinde birinci grup (kontrol) ve dördüncü grupta (7.günde ötanazi) zayıf boyanma, 2. grupta (24 saatte ötanazi) orta boyanma, 3. grupta (48 saatte ötanazi) kuvvetli boyanma gözlenmiştir. Bu bulgular bize radyasyon uygulanan dokularda damar endotelinde VEGF seviyesinin, radyasyon uygulamasından 24 saat sonra strese maruz kalan damar endotel hücrelerinde hafif derecede, 48 saatte ise kuvvetli derecede yükseldiğini göstermiştir. Bu artışın HIF-1 alfa'nın 48. saatteki kuvvetli yükselişine bağlı olduğu düşünüldü. Rabhani ve arkadaşlarının çalışmasında da HIF-1 alfa düzeyinin yükselmesi ile VEGF seviyesi yükselmiştir. VEGF salınımı anjiogenez yolunun önemli bir parçası olup, iyonize radyasyon VEGF salınmasını HIF-1 alfa aracılığı ile artırmaktadır [126, 164]. Ancak 7. günde HIF-1 alfa ve VEGF'ün kontrol grubu seviyesine gerilediğini tesbit ettik. Biz tek fraksiyonda 10 Gy iyonize radyasyon uyguladık. Bu nedenle 7. günde HIF-1 alfa ve VEGF, kontrol grubu seviyesine gerilemiş olabilir. Natsuko ve arkadaşlarında 2010 yılında yaptıkları normal doku hayvan çalışmasında bizim çalışma sonucumuza benzer sonuç elde etmişlerdir Sağlıklı farelerde 8 Gy 15 Gy ve 20 Gy tek fraksiyon tüm vücut ışınlanmasından 5 gün sonra aort endotel hücrelerinde VEGF düzeyinin kontrol grubuna göre azaldığını gözlemlemişler. Yüksek doz iyonize radyasyonun endotel hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve tomurcuklanmasını durdurduğu sonucuna varmışlardır. Bu durumu tek fraksiyonda yüksek doz iyonize radyasyon uygulamasına ve radyasyonun normal endotel hücrelerine uygulanmasına bağlamışlardır. Tümörlü ortamda endotel hücrelerin sessiz olmadığı çoğalmaya devam ettiği ve mikro çevre ilişkili olduğu belirtilmektedir. Ancak radyasyon

uygulamasını ile *de-novo* anjiogenezin bloke edildiğini fakat ışınlanmış alanlardaki nüksün, ışınlanmamış alandaki nükse göre daha dirençli oluşunu da radyasyona bağlı *de-novo* anjiogenez inhibisyonuna bağlı olabileceğini belirtmektedirler [170]. Bizim sonuçlarımız bu çalışma ile örtüşme göstermiştir. Çalışmamızda radyasyon uygulaması sonrasında anjiogenez yolunda pozitif etkili faktörlerden HIF-1 alfa ve VEGF'ün immün histokimyasal olarak 48. saatte arttığını, 7. günde ise kontrol grubu seviyesine düştüğü gözlemlendi. Natsuko'nun çalışmasında radyasyon nedeni ile oluşabilecek hipoksik strese bağlı HIF-1 düzeyine bakılmamıştır. Bizim çalışmamız tek fraksiyonda 10 Gy radyasyon uygulanması sonrasında 48. saatteki HIF-1 alfa artışı ile VEGF artışını immün histokimyasal olarak belirlemiştir. Benzer olarak Rabbani'nin çalışmasında da HIF-1 artışı sonrasında VEGF seviyesinde yükselme izlenmiştir [164]. Bu durum normal dokuya radyasyon uygulaması sonrasında anjiogenez yolunda pozitif etkili faktörlerin (HIF-1,VEGF) yükseldiğini göstermektedir.

HIF-1, hipoksi ile düzenlenen alfa ve oksijen bağımsız beta subünitlerden oluşan heterodimerdir. HIF-1 kompleksi çekirdekdeki HERs'e (*Hypoxia Regulator Elementary*) bağlanarak tümör metabolizması, büyüme ve anjiogenezde rol oynayan 100 den fazla genin salınmasını da uyarabilmektedir. HIF-1 tarafından uyarılan VEGF dışındaki EPO, TGF-beta, PAI-1 ve transferrin de anjiogenezde yüksek aktiviteye sahiptir [42]. Tümörün radyasyona yanıtının VEGF sentezi ile olduğunun keşfi, tümör damar radyo duyarlılığını anlamada önemli bir adım olmuştur. Rabbani ve arkadaşlarının sağlam akciğer dokusu üzerinde fraksiyone doz (8Gyx5) ile yaptıkları çalışmada da HIF-1 alfa artışı sonrasında VEGF artışı görülmüştür [164]. VEGF, endotel hücrelerinin radyasyona olan direncini artırmaktadır. Bu yanıtın negatif etkisi anti anjiogenik ilaçlarla ortadan kaldırılabileceğini, Dicker ve arkadaşları normal hayvan çalışmalarında radyasyon uygulaması ile beraber, anjiogenez yolunda VEGF düzeyini pozitif yönde etkileyen Cox2'nin inhibitörünü kullanarak proliferasyon ve migrasyonu inhibe edip apoptozu artırmayı başarmışlardır [171]. Ning ve arkadaşları da normal doku çalışmalarında VEGF, bFGF, PDGF blokajı yaparak radyasyonla kombine daha güçlü yanıt elde etmişlerdir. HIF-1 normal ve malign dokularda hipoksik yanıtta önemli rol oynamaktadır. Alfa subünitinin

stabilitesi dimer aktivitesini belirlemektir. Bu subünit hipoksi, ROS, nitrojen türleri ve reseptör kinazlar tarafından düzenlenmektedir. Endotel hücre koruyucu sitokinleri *up* regüle edebilmesi ve çeşitli tümör ilişkili uyarılara verdiği yanıtlar nedeniyle HIF-1 mükemmel bir tümör ve normal damar radyasyon duyarlılığı düzenleyicisidir. Farelerde tümör ışınlanmasıyla HIF-1 protein ve aktivite düzeylerinde iki kat artış tespit edilmiştir. Aynı şekilde yolağın altında yer alan VEGF ve bunun gibi sitokinlerde de iki kat artış olmuştur. (Tablo 2.9.1) Ancak in-vitro ışınlanan hücrelerde HIF-1 aktivite artışı olmamıştır. Bu durum tümör ile sağlam mikro çevre ilişkisini açıklayabilir [42, 160, 164].

Oksijen konsantrasyonunun HIF-1 seviyesini düzenlediği ve radyasyon tedavisini takiben HIF-1 *up*-regülasyonu ile tümör oksijenasyonunu değiştirdiği bildirilmektedir [42, 172]. Hipoksi belirleyici olarak bilinen *primonidazol* kullanılarak ışınlanan tümörlerde tedaviden 48 saat sonra büyük miktarda HIF-1 aktivasyonu gösterilmiştir [42, 160]. Moeller ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, tümör hücrelerinde radyoterapiyi takiben HIF aktivitesini kaydetmek için floresan mikroskop kullanılmış, fraksiyone radyoterapi esnasında HIF-1 aktivitesi hafifce azalmıştır. Radyoterapiden yaklaşık 12-24 saat sonra HIF-1 aktivitesi hızla yükselmeye başlamış ve tedaviyi takiben 48 saatte pik yapmıştır. HIF-1 aktivitesi özellikle tümör çevresinde gözlenmiş ve 24-48 saatler arasında tümör merkezine doğru göç etmiştir. Radyoterapi dozu arttıkça HIF-1 düzeyide artmıştır. Işınlanan ve ışınlanmayan gruplar karşılaştırıldığında, ışınlanan tümör hücrelerinde izole edilen dokularda nükleer HIF-1 seviyeleri daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca ışınlanan tümörlerde *pro*-anjiogenik HIF-1 ile düzenlenen VEGF ve PAI-1 seviyeleri ve indirekt düzenlenen bFGF seviyelerinde de artış olmuştur. Bu sonuçlarla radyasyonun in-vivo olarak HIF-1 düzenlenmesinde etkili olduğu ancak in-vitro etkilemediği söylenebilir. Moeller ve arkadaşları bunu kanıtlamak amacı ile yaptığı çalışmada, floresan HIF-1 ile işaretlenmiş fareleri radyoterapi ve radyoterapisiz kollara ayırmıştır. 48 saat sonra hayvanlara iv. marker injekte edilmiş. Radyoterapi alan grupta HIF-1 aktivasyonu damar yatağından uzakta meydana gelmiştir. Radyoterapi ile indüklenen HIF-1 aktivasyonu reoksijenasyon ile de ilişkilidir [172]. Radyoterapiyi takiben tümör reoksijenasyonu çeşitli fizyolojik yanıtlara ikincil

olarak yüksek olabilir görüşüyle, perfüzyon artışı olmasa dahi tümör reoksijenasyonu sağlanabilir. Işınlanan tümörlerde ve yüksek oksijen seviyelerinde HERs sinyal artışı olabilir. Bu durum hipoksi ile uyarılan HIF-1 paradigmasına terstir. Radyoterapi ile uyarılan HIF-1 aktivasyonunun tümör reoksijenasyonu ile uyarıldığı hipotezini desteklemektedir. Hipoksik tümör hücrelerinin in-vitro reoksijenasyonu ROS oluşumuna yol açabilir. Bu durum HIF aktivasyonu için ROS gerekliliğini göstermektedir. Serbest radikale duyarlı H₂DCFDA kullanıldığında ve kısa süreli 2 x 5 Gy radyoterapi sonrası H₂DCFDA sinyali tedavi öncesine göre dramatik olarak yükselmiştir. Radyoterapi sonrası SOD uygulaması ile radyoterapi / reoksijenasyon ile uyarılan H₂DCFDA cevabı tamamen baskılanmıştır. Bu sonuçlar radyoterapinin reoksijenasyonla beraber tümör oksidatif stresinde gecikmiş artışa neden olduğunu göstermektedir. Bununla beraber oksidatif stres tümörde HIF-1 seviyelerini artırmaktadır. Moeller ve arkadaşları da 2004 de radyoterapi sonrası uygulanan antioksidan tedavi ile nükleer HIF-1 artışının tamamen bloke edildiğini gözlemlemişlerdir. Bu yol ile HIF-1 bloke edildiğinde tümör damarlanmasında dramatik bir yıkım izlenmiştir. Antioksidan tedavi radyoterapi reoksijenasyon ile artan HIF-1 aktivasyonunu inhibe ettiğinden ve tümör damarlanması da bu yanıtı bağlı olduğundan, serbest radikal temizlenmesinin radyoteropatik tümör kontrolünü artırdığı sonucuna varılmıştır. SOD mimetik uygulamasının tümör büyümesi üzerine çok az etkisi olmasına rağmen, radyoterapi ile kombine edildiğinde tümör büyüme gecikmesinde önemli etkisi olmuştur. Bu sonuçlar HIF-1 aktivasyonu ve damar radyasyon direnci oluşumunda serbest radikallerinde önemini ortaya koymaktadır [42, 160]. Benzer sonuç Rabbani ve arkadaşlarının çalışmasında da yer almıştır. Bu çalışma normal akciğer dokusunda yapılmış, radyoterapi sonrası 4. hafta da HIF-1 alfa seviyesi anlamlı yükselmiştir. 6. haftada da VEGF seviyesinde anlamlı yükselme görülmüş, bu seviye artışı 10.haftaya kadar devam etmiştir. Ayrıca kapiller proliferasyon indekside 22. haftada anlamlı yükselmiştir [164].

Çalışmamızda HIF-1 alfa antikoru ile boyanmış preparatlarda 3.grupta (48 saat) kuvvetli boyanma izlenirken diğer grupların boyanma şiddeti 3.gruptan (48 saat) belirgin derecede az olmuştur. HIF-1 alfa'nın 48 inci saatte en yüksek seviyeye ulaşması radyasyon ile oluşabilecek hipoksik durumun, HIF-1 alfa artışıyla

düzenlenebileceğini göstermiştir. Ancak bu durumu apoptoz ile ilişkilendirmek doğru olmaz. Tümörlü dokuda radyasyonu takiben endotel hücrelerinde apoptoz 4-8 saatte pik yaparken, vasküler hasar tipik olarak 48 saat sonra başlamaktadır. Ancak radyoterapinin klinik dozlarını takiben apoptoza giden endotel hücre yüzdesi % 0 ile % 8 arasındadır [127]. Chung-yang Li ve arkadaşları ratlarda tümörsüz dil dokusu vasküler endotel hücresi üzerinde yaptıkları, radyasyona bağlı apoptoz çalışmasında, apoptoz 5. günde % 78.3, 8.günde % 89.3, 14. günde % 83.5, 21.günde % 69.3, 21. günde %47.3 olarak gözlemlemiştir [173]. Bu durum tümörlü ve tümörsüz ortamda apoptoz süresinin aynı olmadığını desteklemektedir. Genelde apoptoz radyasyon tarafından uyarılmasına rağmen birçok hücre tipinde ana ölüm mekanizması apoptoz olmayabilir [174]. Ancak bazı yayınlar radyasyon hasarı ile ölen hücrelerde ana mekanizmanın apoptoz olduğu sonucuna varmıştır [4, 122, 137]. Tümörlü ortamda yapılan çalışmalar bu durumu desteklerken, sağlam akciğer dokusu fraksiyone çalışmasında da (8Gy x 5fr) HIF-1 alfa yükselişi 4. haftada anlamlı olmuştur [164]. Apoptoz nedeni ile HIF-1 seviyesi yükselmiş olsaydı bu yükselme daha erken beklenirdi. Çalışmamızda 10 Gy tek fraksiyon radyasyon uygulandı ve HIF-1 alfa boyanması 48.saatte kuvvetli bulundu, fraksiyone uygulama yapılmış olsaydı daha farklı sonuçlarla karşılaşabilirdi.

Stres granülleri, hücrenin mRNA sının yaklaşık yarısını kapsayan sitozolik polimerlerdir. RNA granülleri germ hücrelerinde, somatik hücrelerde ve nöronlarda gen ekspresyonunun *post* transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. RNA granülleri; translasyon faktörleri, çürüme enzimleri, yapısal proteinlerden ve onların lokalizasyonlarından, istikrarından, taşınmasından sorumlu çeşitli ribozomal alt üniteleri de içermektedir. Isı, oksidasyon, radyasyon ve hipoksiye maruz kalan memeli hücrelerinde ortaya çıkan RNA granüllerine stres granülü adı verilmektedir. Strese yanıt olarak memeli hücre mRNA'sı, strese bağlı hasarın tamirinde hücre metabolizmasını değiştirmektedir. Bu değişim de ve ortama uyum sağlamada eIF2 stres granülü ilişkisinde RNA bağlayan TIA-1 de görev almaktadır [42, 158, 159, 168].

Hücrede bir kez stres oluşunca granüller depolimerize olmaktadır. Anderson ve Kedersha 2002 yılında bunu tanımlamışlardır [168]. Moeller ve arkadaşları da hipoksi tehdidi altındaki hücreleri TIAR ile işaretledikten sonra, 4 saatlik inkübasyonda tümör hücrelerinde stres granülü olduğunu göstermişlerdir [42]. Ancak reoksijenasyon sonrası da bu granüller gözlenmemiştir. Stres granülü depolimerasyonu, HIF-1 sinyal salınması ve HIF-1 ile düzenlenen transkriptlerin translasyonunu artırmaktadır. Ancak ışınlanmamış tümörlerde hipoksik tümör çevresinde stres granülü oluşumu görülmesine karşın, ışınlanan tümörlerde stres granülleri daha az yoğunlukta izlenmiştir. Bu durum radyasyon/reoksijenasyonun onların depolimerizasyonuna öncülük ettiğini göstermektedir. İn-vivo olarak stres granülleri hipoksik gen translasyonunun düzenlenmesinde rol oynamakta ve inhibisyonları, radyasyon/ reoksijenasyon ile tersine dönebilmektedir. Stres granülleri normalde görülmemesine rağmen çevresel stres ile birlikte 15 ile 30 dakika içinde hızla ortaya çıkabilirler. Bu granüllerin oluşumu için eIF2 alfanın stres aktive eden kinazlar tarafından fosforilasyonu en kritik noktadır. Ancak eIF2 alfa + GTP + tRNA^{met} kompleksi eIF2 alfa fosforilasyonunu azaltmaktadır. Özellikle bu azalma döneminde stres veren faktörün etkisi ile toplanan TIA proteinlerinin düzenlenmesi de glutaminden zengin prionlar tarafından gerçekleştirilir. Stres granülleri strese maruz kalan dokularda apoptozdan birkaç saat önce ortaya çıkabilirler. Tümör hücrelerini etkilemeden de normal çevre doku üzerinden stres granülü bağlantıları uyarılabilir. Radyasyon hasarının iyileşmesi esnasında radyasyonla uyarılan HIF-1'in düzenlediği transkript yapılar stres granülü bağlantılarının kopmasıyla sekteye uğrayabilirler. Transkriptlerin stres granülü içine hapis olmasıyla inhibe olduğu düşünülmektedir. Stres granülleri iskemi sırasında nöronlarda protein translasyonunu da düzenleyebilirler. *In-vitro* ortamda stres granülleri oluşamaz çünkü strese cevap ancak *in-vivo* mikroçevre içinde oluşabilir [42, 168].

Çalışmamızda eIF2 antikoru immün histokimyasal olarak 1.Grup(kontrol) ile 4.Grup'da (7.gün ötanazi) kuvvetli boyanma göstermiş, 2. Grup (24 saatte ötanazi) ve 3. grup (48 saatte ötanazi) zayıf boyanmıştır. Işınlama sonrasında mesane damar endotelinde, eIF2-alfa düzeyi 24 saatte kontrol grubuna göre düşmüş, 48. saatte yükselme eğilimine geçmiş, 7. günde ise kontrol grubu seviyesine ulaşmıştır. Stres

granülleri, organizma stres ile karşılaştıktan 15 – 30 dakika içinde ortaya çıkabilirler. eIF2-alfa fosforile olduktan sonra düzeyi azalmaktadır [168]. İkinci gruptaki (24 saatte ötanazi) eIF2-alfa düzeyinin düşmesi bunu doğrulamaktadır. Stres granülleri strese maruz kalan dokularda apoptozdan birkaç saat önce ortaya çıkmaktadır. Değişim ve ortama uyum sağlamada eIF2 stres granülü ilişkisinde RNA bağlayan TIA-1 görev almaktadır [42]. eIF2 düzeyinin kırk sekizinci saat ve 7. gündeki yükselme eğilimi de apoptozun oluşmaya başlamasının ve/veya hücrenin stresten kurtulmasının belirtisi olabilir [42, 158, 159, 168]. Chung-yang Li ve arkadaşlarının çalışmasında bu durumu desteklemektedir. Onlarda 5. günde apoptozu belirlemişlerdir [173]. Apoptoz ve/veya hücrenin stresten kurtulması nedeniyle eIF2 boyanması 3.(48 saatte ötanazi) ve 4. grupta (7. günde ötanazi) yükselişe geçmiş olabilir. Ancak bizim çalışmamızda apoptoz belirlenmedi, sadece apoptoz öncesi artan ve azalan faktörler immün histokimyasal olarak gözlemlendi. Kullandığımız yöntem apoptoz belirlemek için uygun yöntem değildi.

Çalışmamızda TIA-1 antikoruna ile yapılan immün histokimyasal değerlendirmede, 1.grupta (kontrol) zayıf boyanma özellikleri gözlenirken, 2. grup (24 saat) ve 4. grup (7. gün) orta derecede, 3. grupta (48 saat) ise oldukça kuvvetli boyanma izlendi. Bu durum 1 grupta (kontrol) stres veren faktör olmadığını, 2. grup (24 saate ötanazi) ve 3. grupta (48 saate ötanazi) stres veren faktöre bağlı olarak TIA-1 seviyesinin artmaya başladığını 3. grupta (48 saatte ötanazi) en üst seviyeye ulaştığını gösterdi. eIF2-alfa fosforile olup stres granülü oluşumunun başlaması ve eIF2-alfa – GTP- tRNA_{met} kompleksi oluşması sonrası eIF2-alfa seviyesi düşmesi ile stres veren faktörlerin etkisiyle toplanan TIA-1 giderek yükselir ve apoptoz öncesi durumu işaret edebilir [42, 158, 159, 168]. Dördüncü grupta (7. günde ötanazi) görülen orta boyanma TIA-1 seviyesinin 1.Grup seviyesine doğru geldiğini ve bize apoptoza gidişi ve/veya hücrenin stresten kurtulmasının belirtisi olabileceğini düşündürdü.

TSP-1 anjiogenez yolunda negatif etkili tek değişkenimizdir. İskemik veya hipoksik stres, patolojik ve fizyolojik anjiogenez için en önemli durumdur [4]. Anjiogenezin fizyolojik ve patolojik oluşumunda damar iç kısmını döşeyen endotel

hücreleri kordon şeklinde bir araya gelirler ve endotel hücrelerinin incilmesi, önceden var olan damarlarla birleşmesi damarlarda çap ve uzunluk artımına neden olmaktadır. Tümör damarları ve patolojik anjiogeneizde gelişen damar yapısı anormal genişler ve kan akımı bu lümen içinde türbülant bir akım oluşturabilir. Bu yüzden akım oldukça yavaştır [1]. Fizyolojik anjiogeneizde ise (menstrasyon, yara iyileşmesi ve embriyo döneminde damar gelişimi) bu durum görülmemektedir. VEGF-189 damar çapını azaltırken, VEGF-121, VEGF-165 damar çapını artırır. Ang-1 de VEGF ile kombine olarak damar çapının artışına neden olur. MEF2C (*Myocoyl enhancer binding factor 2C*) hücre dışında protein yıkımı yaparak tüp oluşumunu engellemektedir. Anjiogenezin patolojik ve fizyolojik yolunda pozitif kontrolde pek çok faktör olmasına rağmen *down* regülasyonda en önemli endojen düzenleyici TSP-1 dir. TSP-1 damar lümen oluşumunu engellemektedir [2, 3].

Çalışmamızda TSP-1 antikoru ile yapılan immün histokimyasal değerlendirmede 1. grup (kontrol) örneklerinde TSP-1 ile boyanma oldukça kuvvetli gözlenirken, 2.grup (24 saatte ötanazi), 3.grup (48 saatte ötanazi) ve 4.grupta (7.günde ötanazi) boyanma özellikleri oldukça zayıf izlendi. Ancak 7 gün de TSP-1 ortalama değerinin 24 ve 48 saatteki ortalama değere göre yükselme eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bu durumu şöyle açıklanabilir; Çalışmamızda stres veren faktör olan, radyasyonun oluşturduğu hipoksi sonucu anjiogeneiz yolunda pozitif etkili faktörler olan HIF-1alfa 3.grupta (48. saat) kuvvetli boyanırken, 4.grupta (7. gün) zayıf boyandı. Stres granülü belirleyici faktör eIF2, 2. grupta (24 saat) zayıf, 3.grupta (48 saat) zayıf boyandı, 4 grupta (7.gün) kontrol grubu seviyesine doğru ilerledi. Stres veren faktörün etkisi ile TIA-1, 2. grupta (24 saat) orta, 3 grup (48 saat) kuvvetli boyanırken, 4 grupta (7.gün) kontrol grubu seviyesine geriledi. VEGF'ün 3. grupta(48 saat) kuvvetli boyanması izlendi. Pozitif etkili faktörlerin yükselmesi, anjiogeneiz yolunda endojen inhibitör olarak görev yapan TSP-1'in 2.grup (24 saat), 3. grupta (48 saat) zayıf boyanmasını, 4. grupta(7.gün) hafif boyanma artışının izlenmeside, anjiogeneiz yolunda pozitif görev yapan faktörlerin azalması nedeniyle TSP-1'in immün histokimyasal olarak boyanma artışını açıklayabilir. Işınlanan damar endotel hücrelerinde hipoksik stres HIF-1 salınmasına veya ROS artışı ile indirekt HIF-1 artışına ve VEGF salınmasına neden olabilir [42]. Anjiogeneiz

yolunda pozitif görev yapan faktörler (HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1) uyarılarak endojen anjiogenez inhibitörü olarak görev yapan TSP-1 düzeyinde düşüşe neden olmuş olabilir. 24.ve 48. saatte stres veren faktör nedeniyle artan HIF-1 alfa ve VEGF ortalama değerlerinin 7 gün sonunda düşmesi de TSP-1'in 7 gün sonunda 1.grup (kontrol) seviyesine doğru gelmesini açıklayabilir. Suzuma ve arkadaşlarında çalışmalarında VEGF artışının, TSP-1 düzeyinde *down* regülasyona, VEGF azalmasında TSP-1 düzeyinde *up* regülasyona neden olduğunu belirtmişti. Bu durum VEGF aracılı negatif *feed-back* mekanizması ile açıklanabilir [169].

6. SONUÇ

Çalışmamızda, iyonize radyasyonun normal mesane damar endotel hücresinde oluşturduğu stres, stres granülleri aktivasyonu ile eIF2 boyanmasının 2.grupta (24 saat) ve 3.grupta (48 saat) zayıf olması, stres veren faktörlerin etkisiyle 2grupta (24 saat) orta, 3.grupta (48 saat) kuvvetli TIA-1 boyanma özelliği olmasıyla apoptoza gidişin başladığı düşünülmüştür. eIF2 düşüşü ve TIA-1 artışı apoptoz öncesi durumu belirleyen faktörlerdir. Apoptoza giden hücrelerde onarım için protein sentezi yapılamaz ve hücre ölüme gitmektedir. Çünkü mRNA üzerinde yer alan ribozomlar protein sentezi yapamayarak stres granülü şekline dönerler [42, 158, 159, 168]. Çalışmamızda HIF-1 alfa salınması sonucu VEGF artışı görülmüş ve de anjiogenezin endojen engelleyicisi TSP-1 seviyesinin düşüşü saptanmış, 7. gün sonunda hafif yükselişe geçtiği izlenmiştir. TSP-1'in anjiogenez yolunda pozitif faktörlerin artması ile düşüşe geçtiği düşünülmüştür. Radyasyon hücrede stres oluşturmaktadır. Bunun sonucu ortaya çıkabilecek sitokinler anjiogenez yolundaki HIF-1 alfa ve VEGF seviyesinde artışa neden olabilir. Tümörlü dokuda radyoterapiyi takiben 4-8 saat içinde endotel hücre apoptozu pik yaparken, vasküler hasar 48.saatte belirginleşir [127]. Ancak normal dokuya radyasyon uygulaması sonrasında, apoptoz 5. günde belirgin hale gelmiş 8. günde en üst düzeye ulaşmıştır [173]. HIF-1'in 48. saatteki artışının apoptoza değil daha önceki çalışmalardaki gibi ROS artışına bağlı olabileceği düşünüldü. Çünkü oluşan reoksijenasyon ile HIF-1 düzeyinde düşme beklerken çalışmamızda 48. saatte HIF-1 artışı gözlemlendi. Daha önce yapılan tümörlü ve normal doku çalışmalarında da anjiogenez yolunda görev yapan pozitif faktörlerin artışı gözlenmiştir [42, 160, 164]. Çalışmamızda radyasyon uygulaması ile anjiogenez yolunda yer alan HIF-1 alfa ve VEGF seviyesinde artış olduğu gözlemlendi.

Radyasyon uygulanması ile normal dokuda anjiogenez yolundaki pozitif etkili faktörlerin artışını gösterirken negatif etkili faktör düşüşünü belirledik. Radyasyon normal dokuda fizyolojik anjiogenezi başlatabilir ve hasarlı normal dokunun iyileşmesini hızlandırabilir. Normal doku ile tümör dokusunun radyasyona cevabı farklıdır. Gelecekte fraksiyone doz uygulamaları ile tasarlanmış moleküler çalışmalar ve diagnostik anjiogenez çalışmaları ile bu konu daha iyi anlaşılabilir.

ÖZET

Radyasyonun İyonizan, Oksidatif ve Redüktif Etkilerinde Faktör Analizi

İyonize radyasyon normal hücre ve dokuda stres oluşturarak, anjiogenez yolunda etkili olan birçok faktörün salınmasını başlatabilir veya azaltabilir. Bu amaç ile 24 adet erkek Swiss albino fare, kontrol grubu ve 24, 48 saat ve 7. günde ötanazi uygulanmak üzere 4 gruba ayrıldı. Birinci grup fareler (kontrol) radyasyon uygulaması öncesinde 45-50mg/kg İM ketaminle sedasyon sağlandıktan sonra kalp içi kan alımı yöntemiyle ötanazi uygulandı. Farelerden 2. grup (24 saatte ötanazi), 3. grup (48 saatte ötanazi) ,4.grupta (7.günde ötanazi) olanların pelvis bölgesine tek fraksiyonda 10 Gy iyonize radyasyon Co- 60 cihazı ile aynı merkezde uygulandı. Uygulama sonrası farelere 45-50 mg/kg İM ketamin ile sedasyon sağlandıktan sonra 2. gruba 24. saatte, 3.gruba 48.saatte, 4. gruba 7. günde kalp içi kan alımı yöntemiyle ötanazi işlemi uygulandı. Pelvik bölgeden mesane organı tam olarak alındı. İmmün histokimyasal metod ve ışık mikroskopu yöntemi ile HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1 ve TSP-1 antikoları kullanılarak mesane damar endotelinde radyasyonun oluşturabileceği stres ve hasar sonucunda normal mesane damar endotelinde anjiogenez yolunda yer alan faktörlerden olan HIF-1 alfa, VEGF, eIF2, TIA-1ve TSP-1'in artıp artmayacağı değerlendirildi.

Çalışmamızda iyonize radyasyon ile mesane damar endotelinde oluşan hipoksik stres sonucunda HIF-1 alfa antikoru ile boyanmış preparatlarda 3.grupta (48. saatte ötanazi) kuvvetli boyanma izlenir iken diğer grupların boyanma şiddeti 3.gruptan belirgin derecede az oldu.

VEGF incelendiğinde, immün histokimyasal olarak, 1.grup (kontrol) ve 4. grupta (7. gün ötanazi) zayıf boyanma izlenirken, 2. grupta (24 saat) orta derecede, 3.grupta ise VEGF ile kuvvetli boyanma izlendi.

Çalışmamızda eIF2- alfa'ya, immün histokimyasal olarak bakıldığında 1. grup (kontrol) ile 4.grup (7. günde ötanazi) kuvvetli boyanma göstermişlerdir. İkinci grup(24 saatte ötanazi) ve 3. grup (48 saatte ötanazi) ise zayıf boyanmıştır.

TIA-1 ile yapılan immün histokimyasal değerlendirmede ise 1.grup (kontrol) zayıf boyanma özellikleri gözlenirken, 2. grup(24 saatte ötanazi) ve 4. grup(7. günde ötanazi) orta derecede, 3. grupta (48 saatte ötanazi) ise oldukça kuvvetli boyanma izlendi.

Çalışmamızda TSP-1 ile boyanma 1. grup (kontrol) örneklerinde oldukça kuvvetli gözlemlenirken, 2.grup(24 saatte ötanazi), 3.grup (48 saatte ötanazi) ve 4. gruplarda (7. günde ötanazi) boyanma özellikleri oldukça zayıf izlendi.

Radyasyon ile daha önce yapılan tümörlü ve normal doku anjiogenez yolu faktör çalışmaları, iyonize radyasyonun anjiogenez yolunda pozitif etkili görev yapan HIF-1 alfa, VEGF, TIA-1 faktörlerinin arttığını, stres granülü oluşumu ile eIF2'nin fosforile olup düştüğünü, göstermiştir. Bu çalışma normal mesane damar endoteli üzerinde yapılmıştır. Önceki normal doku çalışmalarında da anjiogenez yolunda pozitif etkili faktörlerden HIF-1 alfa ve VEGF'ün arttığı gözlenmiştir. Çalışmamızda anjiogenez yolunda yer alan hem pozitif hemde negatif faktörler kullanıldı ve immün histokimyasal olarak bu faktörler değerlendirildi.

Radyasyon uygulaması ile normal dokuda anjiogenez yolundaki pozitif etkili faktörlerin (HIF-1, VEGF, eIF2, TIA-1) arttığı görülürken negatif etkili faktörün (TSP-1) düştüğü belirlendi. Radyasyon normal dokuda fizyolojik anjiogenezi başlatabilir ve hasarlı normal dokunun iyileşmesini hızlandırabilir. Tedavi amaçlı uygulamalarda da normal dokuda oluşabilecek fizyolojik anjiogenez hücre tamir mekanizmasını hızlandırabilir. Gelecekte fraksiyone uygulamalar ile tasarlanmış moleküler çalışmalar ile bu konu daha iyi anlaşılabilir.

Anahtar Kelimeler: Radyasyon, Anjiogenez, Vasküler endotel, HIF-1 alfa, VEGF, eIF2- alfa, TIA-1, TSP-1

SUMMARY

Ionizing radiation may start or reduce the release of several factors which are effective on angiogenesis pathway creating in stress normal cells and tissues. With this aim 24 male 'Swiss Albino' mice were taken and they were separated to four groups; first was control group, second group was euthanized in 24 hours, third group was euthanized in 48 hours, and the fourth group was euthanized in 7 days. Prior to application of radiation, the first group of mice (control) was euthanized by the method of blood puncture from heart after the 45-50mg/kg IM ketamine sedation. 10 Gy of ionizing radiation was applied to all mice's pelvic zone with Co-60 device in the same center. After the application, all mice were euthanized in accordance with procedures. Bladders were taken from pelvis to be evaluated. Immunohistochemistry and light microscopy were used to investigate whether there would be an increase or not in the factors effective on angiogenesis pathway as a result of stress and damage in the vascular endothelium of normal bladder by using the HIF-1 alpha, VEGF, eIF2, TIA-1 and TSP-1 antibodies.

In our study, as a result of hypoxic stress induced with ionizing radiation in the vascular endothelial lining of the bladder, HIF1 alpha antibody stained preparations the third group (euthanasia at 48h), was observed with significantly stronger staining than other groups.

When the VEGF was examined, as immune-histochemically, in the first (control) and fourth groups (7 days euthanasia) a weak staining was seen while it was moderate in the second group (24 hours) and strong VEGF staining was observed in the third group.

In our study, eIF2-alfa when evaluated immune – histochemically, the first (control) and 4th groups (euthanasia on day 7) showed strong staining. The second (24 hours euthanasia), and third groups (48 hours euthanasia) were stained poorly.

In the immune-histochemical results which were applied with TIA-1, while weak staining was observed in the first group, a moderate staining was observed in the second and forth groups, a strong staining was seen in the third group.

In our study while very strong staining of TSP-1 was observed in the first group samples, the second (24 hours euthanasia), third (48 hours euthanasia) and fourth groups euthanasia at 7 days) showed very weak staining.

The previous angiogenesis pathway factor studies in the normal and tumor tissues using radiation showed that ionizing radiation has increased the HIF-1alpha, VEGF, TIA-1 factors which have positive effect on angiogenesis, and decreased eIF2 by phosphorylation induced by stress granule formation. This study was conducted on the vascular endothelium in normal bladder. An increase of positively effective angiogenesis pathway factors HIF-1 alpha and VEGF have been also observed in previous normal tissue studies. In our study, both positively and negatively effective factors on the angiogenesis pathway were evaluated by immune-histochemical method.

It is identified that the positively effective factors (HIF-1, VEGF, eIF2, TIA-1) on the angiogenesis pathway were increased while determining the negative factor (TSP-1) was decreased in the normal tissue with radiation. Radiation may initiate physiological angiogenesis in the normal tissue and accelerate healing in the damaged normal tissue. The physiological angiogenesis occurring in the normal tissues by the radiotherapeutic applications may also accelerate the cell repair mechanism. This subject can be better understood in the future by molecular studies designed in fractionated radiation applications.

Key Words: Radiation, angiogenesis, vascular endothelial, HIF-1 alpha, VEGF, eIF2-alpha, TIA-1, TSP-1

KAYNAKLAR

1. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev* 2011;91: 1071-1121.
2. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998;282: 468-471.
3. Mizukami Y, Kohgo Y, Chung DC. Hypoxia inducible factor-1 independent pathways in tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2007;13: 5670-5674.
4. Gondhowiardjo S. Apoptosis, angiogenesis and radiation treatment. *Acta Med Indones* 2004;36: 100-108.
5. Halperin EC, Perez CA, Brady LW. Perez and Brady's principles and practice of radiation oncology. ed.: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
6. Alper T, Howard-Flanders P. Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of E. coli B. *Nature* 1956;178: 978-979.
7. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiologist. ed.: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
8. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 1976;295: 369-377.
9. Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology. *Radiat Oncol* 2007;2: 5.
10. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235: 442-447.
11. Bosch J, Abraldes JG, Fernandez M, Garcia-Pagan JC. Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension. *J Hepatol* 2010;53: 558-567.
12. Quaegebeur A, Carmeliet P. Oxygen sensing: a common crossroad in cancer and neurodegeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010;345: 71-103.
13. Scardina GA, Messina P. Microvascular abnormalities in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Anat* 2006;188: 425-429.

14. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285: 1182-1186.
15. Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res* 2000;79: 1-38.
16. Dvorak HF. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am J Pathol* 2003;162: 1747-1757.
17. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9: 669-676.
18. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380: 435-439.
19. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380: 439-442.
20. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* 1999;126: 3015-3025.
21. Carmeliet P. Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* 1999;401: 657-658.
22. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999;5: 434-438.
23. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000;6: 460-463.
24. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90: 9355-9358.

25. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87: 1171-1180.
26. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998;8: 529-532.
27. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407: 242-248.
28. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277: 55-60.
29. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998;92: 391-400.
30. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999;5: 495-502.
31. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282: 946-949.
32. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999;5: 1359-1364.
33. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995;13: 765-782.
34. Klagsbrun M. The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* 1989;1: 207-235.

35. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 2000;20: 2260-2268.
36. Mentlein R, Held-Feindt J. Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy? *Naturwissenschaften* 2003;90: 385-394.
37. Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W, Reichmann E. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2002;97: 142-148.
38. Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA, Bucana CD, Gallick GE, Nickols MA, Westlin WF, Ellis LM. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res* 2003;63: 2079-2087.
39. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997;99: 3-8.
40. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 1997;3: 177-182.
41. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oosthuysse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999;98: 147-157.
42. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004;5: 429-441.
43. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ* 2008;15: 678-685.
44. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13: 167-171.
45. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995;270: 1230-1237.

46. Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997;272: 11205-11214.
47. Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10: 1082-1087.
48. Tian H, McKnight SL, Russell DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;11: 72-82.
49. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels. *Mech Dev* 1997;63: 51-60.
50. Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23: 9361-9374.
51. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, Warnecke C, Mandriota S, Bechmann I, Frei UA, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Bachmann S, Maxwell PH, Eckardt KU. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 2003;17: 271-273.
52. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998;7: 205-213.
53. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 2001;414: 550-554.
54. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1996;271: 32253-32259.
55. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close

- sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 1996;16: 1706-1713.
56. Maltepe E, Keith B, Arsham AM, Brorson JR, Simon MC. The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and the neural response to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273: 231-238.
 57. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292: 468-472.
 58. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001;292: 464-468.
 59. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 1996;271: C1172-1180.
 60. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95: 11715-11720.
 61. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 2005;1: 409-414.
 62. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294: 1337-1340.
 63. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002;295: 858-861.
 64. Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *J Biol Chem* 2002;277: 40112-40117.

65. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265: 1582-1584.
66. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, Fujiwara T, Liu W, Bucana CD, Fang B, Lee JJ, Roth JA. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 1998;58: 2288-2292.
67. Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res* 2001;61: 7349-7355.
68. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 2000;14: 391-396.
69. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 2000;275: 25130-25138.
70. Gao N, Jiang BH, Leonard SS, Corum L, Zhang Z, Roberts JR, Antonini J, Zheng JZ, Flynn DC, Castranova V, Shi X. p38 Signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002;277: 45041-45048.
71. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 2000;157: 411-421.
72. Bos R, Zhong H, Hanrahan CF, Mommers EC, Semenza GL, Pinedo HM, Abeloff MD, Simons JW, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-

- inducible factor-1 alpha during breast carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 309-314.
73. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Turley H, Talks K, Pezzella F, Gatter KC, Harris AL. Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br J Cancer* 2001;85: 881-890.
 74. Shi BM, Wang XY, Mu QL, Wu TH, Liu HJ, Yang Z. Angiogenesis effect on rat liver after administration of expression vector encoding vascular endothelial growth factor D. *World J Gastroenterol* 2003;9: 312-315.
 75. Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 2000;14: 34-44.
 76. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vitoria-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res* 2000;60: 490-498.
 77. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Fox PL. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem* 2000;275: 21048-21054.
 78. Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85: 1045-1049.
 79. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 1996;77: 858-863.
 80. Bochner BH, Cote RJ, Weidner N, Groshen S, Chen SC, Skinner DG, Nichols PW. Angiogenesis in bladder cancer: relationship between microvessel density and tumor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87: 1603-1612.

81. Jaeger TM, Weidner N, Chew K, Moore DH, Kerschmann RL, Waldman FM, Carroll PR. Tumor angiogenesis correlates with lymph node metastases in invasive bladder cancer. *J Urol* 1995;154: 69-71.
82. Blancher C, Moore JW, Talks KL, Houlbrook S, Harris AL. Relationship of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression to vascular endothelial growth factor induction and hypoxia survival in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;60: 7106-7113.
83. Bos R, van der Groep P, Greijer AE, Shvarts A, Meijer S, Pinedo HM, Semenza GL, van Diest PJ, van der Wall E. Levels of hypoxia-inducible factor-1alpha independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 2003;97: 1573-1581.
84. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7: 1661-1668.
85. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61: 2911-2916.
86. Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001;93: 266-276.
87. Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Yoshida J, Hayashi A, Ota M, Katsuyama Y, Melillo G, Konishi I. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha, hypoxia-inducible factor 2alpha, and von Hippel-Lindau protein in epithelial ovarian neoplasms and allelic loss of von Hippel-Lindau gene: nuclear expression of hypoxia-inducible factor 1alpha is an independent prognostic factor in ovarian carcinoma. *Hum Pathol* 2007;38: 1310-1320.
88. Irie N, Matsuo T, Nagata I. Protocol of radiotherapy for glioblastoma according to the expression of HIF-1. *Brain Tumor Pathol* 2004;21: 1-6.
89. Kim SJ, Rabbani ZN, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Vollmer RT, Schreiber EG, Oosterwijk E, Kelley MJ. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and

- MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005;49: 325-335.
90. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399: 271-275.
 91. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Jr., Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 10595-10599.
 92. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood* 1997;90: 3322-3331.
 93. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100: 57-70.
 94. Raval RR, Lau KW, Tran MG, Sowter HM, Mandriota SJ, Li JL, Pugh CW, Maxwell PH, Harris AL, Ratcliffe PJ. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol Cell Biol* 2005;25: 5675-5686.
 95. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007;11: 407-420.
 96. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 2002;1: 237-246.
 97. Kondo K, Kim WY, Lechpammer M, Kaelin WG, Jr. Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003;1: E83.
 98. Covello KL, Simon MC, Keith B. Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. *Cancer Res* 2005;65: 2277-2286.

99. Arabi A, Wu S, Ridderstrale K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlen S, Hydbring P, Soderberg O, Grummt I, Larsson LG, Wright AP. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 2005;7: 303-310.
100. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 2007;11: 335-347.
101. Bindra RS, Vasselli JR, Stearman R, Linehan WM, Klausner RD. VHL-mediated hypoxia regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62: 3014-3019.
102. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *Am J Pathol* 2003;163: 1437-1447.
103. Esteban MA, Tran MG, Harten SK, Hill P, Castellanos MC, Chandra A, Raval R, O'Brien T S, Maxwell PH. Regulation of E-cadherin expression by VHL and hypoxia-inducible factor. *Cancer Res* 2006;66: 3567-3575.
104. Evans AJ, Russell RC, Roche O, Burry TN, Fish JE, Chow VW, Kim WY, Saravanan A, Maynard MA, Gervais ML, Sufan RI, Roberts AM, Wilson LA, Betten M, Vandewalle C, Berx G, Marsden PA, Irwin MS, Teh BT, Jewett MA, Ohh M. VHL promotes E2 box-dependent E-cadherin transcription by HIF-mediated regulation of SIP1 and snail. *Mol Cell Biol* 2007;27: 157-169.
105. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006;440: 1222-1226.
106. Arya M, Ahmed H, Silhi N, Williamson M, Patel HR. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12-CXCR4 (chemokine ligand-receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumour Biol* 2007;28: 123-131.
107. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;10: 858-864.

108. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414: 105-111.
109. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005;9: 617-628.
110. Helczynska K, Kronblad A, Jogi A, Nilsson E, Beckman S, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ. *Cancer Res* 2003;63: 1441-1444.
111. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 5431-5436.
112. Lee YM, Jeong CH, Koo SY, Son MJ, Song HS, Bae SK, Raleigh JA, Chung HY, Yoo MA, Kim KW. Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development. *Dev Dyn* 2001;220: 175-186.
113. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006;20: 557-570.
114. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407: 249-257.
115. Acker T, Diez-Juan A, Aragonés J, Tjwa M, Brusselmans K, Moons L, Fukumura D, Moreno-Murciano MP, Herbert JM, Burger A, Riedel J, Elvert G, Flamme I, Maxwell PH, Collen D, Dewerchin M, Jain RK, Plate KH, Carmeliet P. Genetic evidence for a tumor suppressor role of HIF-2alpha. *Cancer Cell* 2005;8: 131-141.
116. Mack FA, Rathmell WK, Arsham AM, Gnarr J, Keith B, Simon MC. Loss of pVHL is sufficient to cause HIF dysregulation in primary cells but does not promote tumor growth. *Cancer Cell* 2003;3: 75-88.
117. Koshiji M, Kageyama Y, Pete EA, Horikawa I, Barrett JC, Huang LE. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* 2004;23: 1949-1956.

118. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97: 9082-9087.
119. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 2001;61: 6669-6673.
120. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF. BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 2007;27: 6229-6242.
121. Biju MP, Akai Y, Shrimanker N, Haase VH. Protection of HIF-1-deficient primary renal tubular epithelial cells from hypoxia-induced cell death is glucose dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289: F1217-1226.
122. Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* 2003;300: 1155-1159.
123. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29: 15-18.
124. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267: 10931-10934.
125. Denekamp J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 1993;66: 181-196.
126. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, Seetharam S, Koons A, Hari DM, Kufe DW, Weichselbaum RR. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* 1999;59: 3374-3378.
127. Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Hallahan DE. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61: 2413-2419.
128. Hess C, Vuong V, Hegyi I, Riesterer O, Wood J, Fabbro D, Glanzmann C, Bodis S, Pruschy M. Effect of VEGF receptor inhibitor PTK787/ZK222584 [correction of ZK222548] combined with ionizing radiation on endothelial cells and tumour growth. *Br J Cancer* 2001;85: 2010-2016.

129. Kozin SV, Boucher Y, Hicklin DJ, Bohlen P, Jain RK, Suit HD. Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001;61: 39-44.
130. Lund EL, Bastholm L, Kristjansen PE. Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts. *Clin Cancer Res* 2000;6: 971-978.
131. Ning S, Laird D, Cherrington JM, Knox SJ. The antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 increase the antitumor effects of fractionated irradiation. *Radiat Res* 2002;157: 45-51.
132. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002;64: 993-998.
133. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 2002;64: 326-333.
134. Gold LI, Jussila T, Fusenig NE, Stenback F. TGF-beta isoforms are differentially expressed in increasing malignant grades of HaCaT keratinocytes, suggesting separate roles in skin carcinogenesis. *J Pathol* 2000;190: 579-588.
135. Devy L, Blacher S, Grignet-Debrus C, Bajou K, Masson V, Gerard RD, Gils A, Carmeliet G, Carmeliet P, Declerck PJ, Noel A, Foidart JM. The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *FASEB J* 2002;16: 147-154.
136. Carlevaro MF, Albini A, Ribatti D, Gentili C, Benelli R, Cermelli S, Cancedda R, Cancedda FD. Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *J Cell Biol* 1997;136: 1375-1384.
137. Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293: 293-297.

138. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350: 2335-2342.
139. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92: 5510-5514.
140. Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998;17: 3005-3015.
141. Mizukami Y, Jo WS, Duerr EM, Gala M, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Zukerberg LR, Kohgo Y, Lynch MP, Rueda BR, Chung DC. Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med* 2005;11: 992-997.
142. Hopfl G, Wenger RH, Ziegler U, Stallmach T, Gardelle O, Achermann R, Wergin M, Kaser-Hotz B, Saunders HM, Williams KJ, Stratford IJ, Gassmann M, Desbaillets I. Rescue of hypoxia-inducible factor-1alpha-deficient tumor growth by wild-type cells is independent of vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2002;62: 2962-2970.
143. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60: 4010-4015.
144. Mizukami Y, Li J, Zhang X, Zimmer MA, Iliopoulos O, Chung DC. Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer Res* 2004;64: 1765-1772.
145. Mizukami Y, Fujiki K, Duerr EM, Gala M, Jo WS, Zhang X, Chung DC. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor through the induction of phosphatidylinositol 3-kinase/Rho/ROCK and c-Myc. *J Biol Chem* 2006;281: 13957-13963.
146. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001;61: 6050-6054.

147. Pore N, Liu S, Shu HK, Li B, Haas-Kogan D, Stokoe D, Milanini-Mongiati J, Pages G, O'Rourke DM, Bernhard E, Maity A. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2004;15: 4841-4853.
148. Jin HG, Yamashita H, Nagano Y, Fukuba H, Hiji M, Ohtsuki T, Takahashi T, Kohriyama T, Kaibuchi K, Matsumoto M. Hypoxia-induced upregulation of endothelial small G protein RhoA and Rho-kinase/ROCK2 inhibits eNOS expression. *Neurosci Lett* 2006;408: 62-67.
149. Baudino TA, McKay C, Pendeville-Samain H, Nilsson JA, Maclean KH, White EL, Davis AC, Ihle JN, Cleveland JL. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 2002;16: 2530-2543.
150. Shchors K, Shchors E, Rostker F, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Evan GI. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev* 2006;20: 2527-2538.
151. Knies-Bamforth UE, Fox SB, Poulsom R, Evan GI, Harris AL. c-Myc interacts with hypoxia to induce angiogenesis in vivo by a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Cancer Res* 2004;64: 6563-6570.
152. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *J Immunol* 2000;165: 1013-1021.
153. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IkappaB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFkappaB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 18154-18159.
154. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999;401: 82-85.
155. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* 2004;6: 447-458.

156. Xu L, Pathak PS, Fukumura D. Hypoxia-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathways contributes to expression of interleukin 8 in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2004;10: 701-707.
157. Cramer M, Nagy I, Murphy BJ, Gassmann M, Hottiger MO, Georgiev O, Schaffner W. NF-kappaB contributes to transcription of placenta growth factor and interacts with metal responsive transcription factor-1 in hypoxic human cells. *Biol Chem* 2005;386: 865-872.
158. Anderson P, Kedersha N. RNA granules. *J Cell Biol* 2006;172: 803-808.
159. Ulusu N. Stres Granülleri Oluşumunda Kalsiyumun Olası Rolü. *Türk Biyokimya Dergisi* 2009;34: 51.
160. Moeller BJ, Dewhirst MW. Raising the bar: how HIF-1 helps determine tumor radiosensitivity. *Cell Cycle* 2004;3: 1107-1110.
161. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133: 275-288.
162. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175: 409-416.
163. Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972;136: 261-276.
164. Rabbani ZN, Mi J, Zhang Y, DeLong M, Jackson IL, Fleckenstein K, Salahuddin FK, Zhang X, Clary B, Anscher MS, Vujaskovic Z. Hypoxia inducible factor 1alpha signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiat Res* 2010;173: 165-174.
165. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer* 2006;93: E73-80.
166. Papandreou I, Krishna C, Kaper F, Cai D, Giaccia AJ, Denko NC. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. *Cancer Res* 2005;65: 3171-3178.
167. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000;88: 1474-1480.

168. Kedersha N, Anderson P. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 2002;30: 963-969.
169. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Oh H, Honda Y. Expression of thrombospondin-1 in ischemia-induced retinal neovascularization. *Am J Pathol* 1999;154: 343-354.
170. Imaizumi N, Monnier Y, Hegi M, Mirimanoff RO, Ruegg C. Radiotherapy suppresses angiogenesis in mice through TGF-betaRI/ALK5-dependent inhibition of endothelial cell sprouting. *PLoS One* 2010;5: e11084.
171. Dicker AP, Williams TL, Grant DS. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation. *Am J Clin Oncol* 2001;24: 438-442.
172. Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, Raleigh JA, Van der Kogel AJ. Changes in blood perfusion and hypoxia after irradiation of a human squamous cell carcinoma xenograft tumor line. *Radiat Res* 2000;153: 398-404.
173. Li CY, Hong Y, Tao XA, Xia J, Cheng B. The correlation between the severity of radiotherapy-induced glossitis and endothelial cell injury in local tissues in a rat model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16: e711-715.
174. Abend M. Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol* 2003;79: 927-941.