

# Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (*VEGF*) Geni -460 C/T, -141 A/C, +405 G/C Polimorfizmleri ve Türk Hastalarda Hepatoselüler Karsinoma Riski: Vaka-Kontrol Analizi

## Vascular Endothelial Growth Factor (*VEGF*) Gene -460 C/T, -141 A/C, +405 G/C Polymorphisms and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Turkish Patients: Case-Control Analysis

Dr. Mircelal KAZIMI,<sup>a</sup>  
Dr. Sinem NALBANTOĞLU,<sup>b</sup>  
Dr. Murat KILIÇ,<sup>a</sup>  
Dr. Afig BERDELİ<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Özel Kent Hastanesi,  
Organ Nakli Merkezi,  
<sup>b</sup>Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,  
Çocuk Genetik BD,  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 07.02.2010  
Kabul Tarihi/Accepted: 21.04.2010

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Mircelal KAZIMI  
Özel Kent Hastanesi,  
Organ Nakli Merkezi, İzmir,  
TÜRKİYE/TURKEY  
kmrjalal@gmail.com

**ÖZET Amaç:** Vasküler endotelial büyüme faktör (*VEGF*) geni, hepatoselüler karsinomun da dâhil olduğu çeşitli tümör tiplerinin anjiyogenik gelişiminde önemli role sahip olarak gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, *VEGF* geninde yer alan mutasyon ve polimorfizm niteliğindeki belirli DNA dizi değişimlerinin, Türk hastalarda, hastalık patogenezi ile bağlantısının retrospektif olarak gösterilmesidir. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya, Ege Üniversitesi Organ nakli merkezinde tedavi gören karaciğer sirozu zemininde gelişmiş hepatoselüler karsinom tanısı alarak ortotopik karaciğer nakli uygulanmış 73 hasta katılmıştır. Yöntem olarak PCR-RFLP genotipleme-polimorfizm analizi kullanılmıştır. **Bulgular:** *VEGF* geni -460 C/T, -141 A/C, +405G/C polimorfizmleri hasta ve kontrol grubu arasında Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuş ( $p > 0.05$ ), bu polimorfizmlerin genotip dağılımı ve allel frekansları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). *VEGF* geni -460 C/T, -141 A/C, +405 G/C polimorfizmleri ile hepatoselüler karsinom riski ve kötü prognoz arasında herhangi anlamlı düzeyde bir ilişki saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ). Hastaların %77,3'ü 4 yıllık sağkalım ve %96,2'si nakil sonrası rekürrensiz sağkalım sergilemişlerdir. **Sonuç:** Çalışma grubunda yer alan 73 Türk hepatoselüler karsinom hastasında risk ve *VEGF* geni -460 C/T, -141 A/C, +405 G/C polimorfizmleri arasında bir ilişki gözlenmemiştir ve bu sonuç, anjiyenez, sağkalım ve nakil sonrası erken rekürrensin tahmin edilebilmesinde çalışmada yer alan Türk hepatoselüler karsinom hastalarında zayıf prognostik gösterge olarak nitelendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Karsinom, karaciğer hücresi; karaciğer nakli;  
damar endoteli büyüme faktörü A; anjiyogenezi indükleyen ajanlar

**ABSTRACT Objective:** Vascular endothelial growth factor (*VEGF*) gene plays an important role in angiogenesis and progression of various tumor types, including hepatocellular carcinoma. The aim of the present study is to retrospectively show the association between certain sequence variants as mutation or polymorphism in *VEGF* gene and pathogenesis of the disease. **Material and Methods:** 73 Turkish patients were enrolled into the study who had undergone orthotopic liver transplantation (OLT) with the diagnosis of cirrhotic liver hepatocellular carcinoma in Ege University Center of Transplantation. For polymorphism-genotyping analysis PCR-RFLP method was used. **Results:** The distribution of genotypes and allele frequencies of the -141 A/C, -460 C/T and +405 G/C polymorphisms in patients group did not differ from those in the control group ( $p > 0.05$ ). In genotype-phenotype correlation analysis, no association was found between these polymorphisms and clinicopathological parameters of tumor invasion and angiogenesis ( $p > 0.05$ ). Following retrospective analysis, the prospective post-transplantation findings comprised that 92% of the study group consisted one single tumor  $\leq 5$  cm or no more than three tumors each of which no larger than 3 cm. The findings indicated a 4-year survival in 77.3% and a post-transplantation overall survival without recurrence in 96.2% of the patients group. **Conclusion:** -141 A/C, -460 C/T and +405 G/C polymorphisms of *VEGF* gene may not be associated with the risk of hepatocellular carcinoma in the studied Turkish patients indicating poor prognosis for angiogenesis, survival and prediction of early recurrence in hepatocellular carcinoma patients in the post-transplantation period.

**Key Words:** Carcinoma, liver cell; liver transplantation;  
vascular endothelial growth factor A; angiogenesis inducing agents

**H**epatosellüler karsinom genellikle sirotik karaciğer zemininde gelişen, nodüler lezyonlarla karakterize, sıklıkla hiler lenf ganglionlarına ve akciğere metastaz yapan karaciğerin malign neoplazisidir. Hepatit C ve hepatit B enfeksiyonu temelli siroz başta olmak üzere; alkolik karaciğer hastalığı, tirozinemi, hemokromatozis de hepatosellüler karsinom gelişimi için risk faktörleridir.<sup>1</sup> Hepatosellüler karsinom lezyonlarında iyi, orta ve kötü olarak evrelendirilen patolojik farklılaşma, hasta prognozunun belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.<sup>2</sup> Hepatosellüler karsinom, hepatit veya sirozun neden olduğu kronik karaciğer hasarının prevalansının yüksek olması nedeniyle dünyada solid organ malignitelerinde baş sırada yer almaktadır.

Hepatosellüler karsinomda uygulanan tedavi stratejileri; cerrahi yaklaşım, bölgesel tedaviler, sistematik tedavi olarak gruplandırılabilir.<sup>3</sup> Tümörün çıkarılmamasının nedeni kötü karaciğer fonksiyonları ise karaciğer nakli en iyi tedavi yaklaşımıdır. En uygun nakil adayları; tek lezyon <5 cm veya 3 nodüle kadar <3 cm kitlesi olan adaylardır. Son yıllarda hepatosellüler karsinomda canlı donör karaciğer nakli adayı olmak için gerekli kriterler genişletilmektedir.<sup>4</sup> Bu seçim ölçütleri sayesinde, 5 yılda sağkalım oranları >%70 ve bekleme listesinde ölüm oranları <%15 olmuştur.<sup>5</sup>

Hepatosellüler karsinom vasküler tümördür, tümör hücresi invazyonu ve anjiyogenezi, tümör büyüme ve yayılımında anahtar basamak olan biyolojik prostestir.<sup>6</sup> Anjiogenik fenotip, anjiogenezi düzenleyen negatif ve pozitif düzenleyiciler (çevresel ve hücrel tetikleyiciler) arasındaki dengenin değişmesi ile ortaya çıktığından, anjiogenezi sırasında tümör hücrelerinin çok miktarda anjiogenik faktörler salgıladıkları kabul edilmektedir.<sup>7</sup>

Anjiogenezi yer alan moleküller arasında, damar endoteli büyüme faktörü A (VEGF) geni ve reseptörleri en çok araştırılanlardan biri olmuştur. VEGF, epitelyal hücrelerin uzamasını ve yeni damar oluşumunu tetikler. VEGF geninde bulunan polimorfizmler, değişken ekspresyon ve plazma protein seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. VEGF geninin, kimi gen ekspresyon miktarlarını da etkileyebilen 70'den fazla polimorfizmi bilinmektedir.<sup>8</sup>

Şimdiye kadar yapılmış olan çalışmalarda, VEGF geni anjiogenezi etkileri kanser başta olmak üzere birçok çalışmada araştırılmış, bazılarında VEGF ve anjiogenezi arasında korelasyon kurulmuş iken, bazılarında kurulamamıştır. Bu çalışmanın amacı, çalışma grubumuzu oluşturan, tedavi amaçlı karaciğer transplantasyonu yapılmış hepatosellüler karsinomlu Türk hastalarda VEGF gen polimorfizmlerinin anjiogenezideki öneminin araştırılmasıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HASTALARIN KARAKTERİZASYONU

Ege Üniversitesi Organ Nakli Merkezi hepatosellüler Karsinomlu hastalarda Milan kriterlerine önem vermektedir, fakat organ nakli uygulanacak olan hastalarda, nodül karakteristikleri Milan ölçütlerini aşıyor ise bu noktada tümör kitlenin ölçüsü kadar önemli olan ven invazyonu, hiliar lenf bezi invazyonu ve uzak metastaz (örn: akciğer) taramaları yapıldıktan sonra endikasyon içine dahil edilmektedir. Taramada, radyolojik yöntemler ile beraber AFP düzeyleri dikkate alınmaktadır. Karaciğer sirozu hastalarına ameliyat öncesi nakil öncesi dönemde biyokimyasal ve radyolojik taramalar uygulanmaktadır. Bu dönemde yüksek AFP değerleri tanı almadan önceki dönemde hepatosellüler Karsinoma şüphesini uyandırır da, AFP normal ve düşük olan vaka gruplarında (bu çalışmada  $\geq 400$  µg/L olan 9 birey) abdominal-BT, abdominal-MR, abdominal doppler USG uygulamaları ile birlikte akciğer, kemik ve uzak organ metastazları da taranmaktadır. Ameliyat öncesi görünmeyen karsinomlar ise ameliyat sonrası hepatektomi sonrası patolojik inceleme sonucu saptanmaktadır (bu çalışmada karsinomlar ameliyat öncesi taramalarda saptanmıştır).

Çalışmaya 1999-2009 yılları arasında Ege Üniversitesi Organ Nakli Merkezi'nde karaciğer sirozu zemininde gelişmiş olan hepatosellüler karsinom tanılı ortotopik karaciğer nakli uygulanmış toplam 73 hasta alınmıştır. 73 hastanın 60'ı erkek (%82), 13'ü (%18) kadındır. Tüm vaka grubu, karaciğer nakli öncesinde biyopsi, tomografi ve biyokimyasal kan parametrelerinin ameliyat öncesi olarak incelenmesi sonucu tanı almış ve bu nakil sonrası pa-

tolojik inceleme esnasında doğrulanmıştır. Hastalardan 17'sine (%23) kadavradan, 56'sına canlı donörden (%77) karaciğer nakli uygulanmıştır. 73 vakanın 67'si (%91.78) Milan ölçütlerinde,<sup>10</sup> kalan 6 (%8.21) vaka ise Milan ölçütleri dışında gözlenmiştir. Milan ölçütleri dışında gözlenen 6 vaka, canlı donörden karaciğer nakli uygulanan %77'lik grup içinde yer almaktadır. Karaciğer nakil sonrası klinikopatolojik parametre olarak nodül sayısı, nodül boyutu, diferansiyasyon derecesi, portal ven invazyonu, AFP değerleri (ng/ml) ve sağlıklı (tümör rekürrensi gerçekleşmeden) sağkalım oranları patolojik değerlendirmeye alınmıştır. Hepatoselüler karsinoma histopatolojik olarak Grade I, Grade II ve Grade III-IV<sup>6</sup> olarak derecelendirilmiştir. 73 hastada; 20 kişi Grade I olarak, 37 kişi Grade II ve 16 kişi Grade III-IV olarak derecelendirilmiştir.

Ayrıca, herhangi bir karaciğer hastalığı ve hiçbir sistemik ve kronik hastalığı olmayan 62, 88 ve 90 sağlıklı birey kontrol grubumuzu oluşturmuştur. Çalışmaya katılan hastaların tamamı gönüllü olur formunu imzalamışlardır. Karaciğer nakli yapılan hasta grubunun klinikopatolojik parametreleri ve demografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Karaciğer naklini takiben, multidisipliner bir yaklaşımla, hastalar tacrolimus, mycophenolate mofetil, rapamucine ve methylprednisolone'ı içeren rutin immünsupresif tedavi görmüşlerdir. Nakil esnasında uzaklaştırılan tüm karaciğer organları patolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Hepatoselüler karsinom evreleme International Union Against Cancer tarafından belirlenmiş pTNM klasifikasyonuna ve histolojik dereceleme Edmondson Ölçütleri'ne<sup>9</sup> göre düzenlenmiştir. Nakil sonrası tümör rekürrensi, ilk yıl boyunca her 3 ayda bir ve ardından her 6 ayda, karaciğer ultrasonografisi ve  $\alpha$ -fetoprotein düzeyleri ile belirlenmiştir. Tüm vücut bilgisayarlı tomografi (BT) ve kemik sintigrafisi yıllık olarak rekürrens şüphesine dayalı olarak yapılmış ve şüpheli lezyonlar, rekürrensi doğrulamak amacıyla biyopsi yapılmıştır.

Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylerden DNA eldesi için EDTA içeren tüpler içerisine 1cc kan örneği gen mutasyon analizi için alınmıştır. Periferik kan lökositlerinden total genomik DNA eks-

**TABLO 1:** Hasta karakteristikleri ve hepatoselüler karsinom prognostik risk faktörleri.

Faktör	Veri Sayısı (%)
<b>Demografik veri</b>	
Yaş (y)	55. 4932 ± 9.665 (Ortalama ± S. Sapma; 2-65) yıl
<b>Cinsiyet</b>	
- Erkek	60 (%82)
- Kadın	13 (%18)
<b>Klinik veri</b>	
<b>Etyoloji</b>	
<b>Siroz</b>	
- HBV	44 (%60.2)
- HCV	9 (%12.3)
- GDH glikojen depo hastalığı	3 (%4.1)
- PBS primer bilyer siroz	3 (%4.1)
- Alkol	3 (%4.1)
- Kriptojenik	5 (%6.8)
- HBV+HDV	3 (%4.1)
- Tirozinemi	3 (%4.1)
<b>Siroz dışı</b>	0
<b>Tümör verileri</b>	
<b>Nodül sayı ve büyüklüğü</b>	
Milan ölçütlerine uygun (%91.78)	
Tek. ≤5 cm	48 (%65.7)
≤3 nodül. ≤3 cm	19 (%26)
Milan ölçütleri dışında (%8.21)	
≤3 nodül. <10 cm	6 (%8.2)
<b>Portal Ven İnvazyonu</b>	
- Yok	31 (%42.5)
- Var	42 (%57.5)
<b>Histopatolojik derece-farklılaşma</b>	
G1	20 (%27.39)
GII	37 (%50.6)
GIII-IV	16 (%21.9)
<b>pTNM derecelendirme</b>	
T1	5 (%6.8)
T2	20 (%27.3)
T3-4	48 (%65.7)
<b>Serum AFP düzeyi (µg/L)</b>	
<400 µg/L	64 (%87.6)
≥400 µg/L	9 (%12.3)

traksiyonu, tuzsuz yöntem olan kolon saflaştırılması ile yapılmıştır. Bu amaçla Qiagen mini blood DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. DNA saflığının ölçülmesi için, NanoDrop Spektrofotometre cihazında 280 nm dalga boyunda DNA solüsyonunun

absorbans intensitesi ölçülmüştür. DNA kalitesi, 2 uL (100 ng) DNA molekülünün %1'lik agaroz jelde elektroforezi sonucunda belirlenmiştir. MMP gen polimorfizmlerinin genotipleme analizi polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PCR-RFLP) metodu ile gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyon reaksiyonları için 100 ng genomik DNA, 1X PCR Buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) ve 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 200 mM her bir deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Promega, Madison, WI), 10 µM sense ve 10 µM antisense primerleri 1.0 U AmpliTaq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City CA) olmak üzere ve deionize su ile toplam 25µL'ye tamamlanan karışım PCR işlemine tabi tutulmuştur. Pozitif PCR ürünlerinin RFLP işlemi; *VEGF* geni -141 A/C polimorfizmi için HhaI enzimi; *VEGF* geni -460 C/T polimorfizmi için BstU1 enzimi; *VEGF* geni +405G/C polimorfizmi için ise BsmF1 restriksiyon enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Genotip dağılımı ve allel frekanslarının Hardy-Weinberg eşitlik analizi ile vaka ve kontrol grupları arası genotip dağılımı ve allel frekanslarının istatistik analizi SPSS 13.0 programında Ki Kare testi ile ( $p < 0.05$  anlamlı kabul edilerek) gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

### VAKA-KONTROL ANALİZİ SONUÇLARI

*VEGF* -460 C/T, *VEGF* -141 A/C, *VEGF* +405G/C polimorfizmleri hasta ve sağlıklı grup arasında Hardy-Weinberg dengesinde bulunmuş ( $p > 0.05$ ), genotip dağılımı ve allel frekansları, iki grup arasında anlamlı farklılıkta saptanmamıştır ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2). Bununla birlikte, nodül sayısı, nodül boyutu, farklılaşma ve portal ven invazyonu klinikopatolojik parametreleri ile *VEGF* -460 C/T, *VEGF* -141 A/C ve *VEGF* +405G/C polimorfizmleri arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ) (Tablo 3).

### ORTOTOPIK KARACİĞER NAKLİ (POST-OLT) SONUÇLARI: REKÜRRENS, SAĞKALIM VE *VEGF*

Nakil sonrası ortalama hasta klinik izlemi 5.1887  $\pm$  1.9 (3-10) yıldır. Ortalama sağkalım süresi  $9.518 \pm 0.268$  yıl (Ortalama  $\pm$  S. Sapma); (95% GA; 8.992-10.044) ve ortanca değer (medyan)  $5 \pm 1.8$  olarak bulunmuştur. Gözlenen sağkalım süreleri: 1 yıllık %100, 3 yıllık %95 ve 5 yıldan fazla 10 yıla kadar %39.6 olarak bulunmuştur. 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve nodül sayısı 3'den fazla olmayan hastalar (1 tümör  $\leq$  5 cm olan veya her biri 3 cm'den büyük olmadan 3 tümörden

**TABLO 2:** Hasta ve kontrol grubu arasında araştırılan *VEGF* gen polimorfizmleri genotip dağılımı ve allel frekansları.

		Hasta gurubu n=73 (%)	Kontrol gurubu n: 62, 88, 90 (%)	$p$ ( $\chi^2$ (2;0.05))	OR (95% GA)
<i>VEGF</i> -141 A/C	AA genotipi	60 (82.2)	76 (86.4)	0.467 (0.529)	Referent
	AC genotipi	13 (17.8)	12 (13.6)		
	CC genotipi	0	0		
	A alleli	133 (91.1)	164 (93.2)		
	C alleli	13 (8.9)	12 (6.8)		
<i>VEGF</i> -460 C/T	CC genotipi	18 (24.7)	20 (32.3)	0.515 (1.325)	Referent
	CT genotipi	28 (38.4)	24 (38.7)		
	TT genotipi	27 (37)	27 (29)		
	C alleli	64 (43.8)	64 (51.6)		
	T alleli	82 (56.2)	60 (48.4)		
<i>VEGF</i> +405 G/C	CC genotipi	14 (19.2)	5 (10)	0.147 (3.829)	Referent
	GC genotipi	35 (47.9)	47 (45.6)		
	GG genotipi	24 (32.9)	38 (44.4)		
	C alleli	63 (43.2)	123 (32.8)		
	G alleli	83 (56.8)	57 (67.2)		

OR: odds oranı; GA: güvenilirlik aralığı.

**TABLO 3:** Hasta grubu klinikopatolojik verileri ile MMP gen polimorfizmleri genotip frekansları.

VEGF Genotip Dağılımı	Klinikopatolojik Parametreler			p	Nodül Farklılaşması			p	Portal Ven İnvazyonu		p
	Nodül sayı ve büyüklüğü				GI	GII	GIII-IV		Var	Yok	
	Tek, ≤5 cm n=48 (%65.7)	≤3 nodül, her biri ≤3 cm n=19 (%26)	≤3 nodül, her biri <10 cm n=6(%8.2)								
<b>-141 A/C</b>											
AA	38(%79.1)	11 (%57.8)	4(%66.6)	>0.05	11(%55)	25 (%67.5)	7 (%43.7)	>0.05	29(%69)	21(%67.7)	>0.05
AC	10(%20.8)	8 (%42.1)	2(%33.3)		9 (%45)	12 (%32.4)	9(%56.2)		13(%30.9)	10(%32.2)	
CC	-	-	-		-	-	-		-	-	
<b>-460 C/T</b>											
CC	12 (%25)	4 (%21)	2(%33.3)	>0.05	6(%30)	11 (%29.7)	3 (%18.7)	>0.05	8(%19)	8(%25.8)	>0.05
CT	16 (%33.3)	5 (%26.3)	1(%16.6)		7 (%35)	14 (%37.8)	5(%31.2)		10(%23.8)	9(%29)	
TT	20 (%41.6)	10 (%52.6)	3(%50)		7(%35)	12 (%32.4)	8(%50)		24(%57.1)	14(%45.1)	+
<b>405 G/C</b>											
CC	10 (%20.8)	8(%42.1)	1(%16.6)	>0.05	5(%25)	10(%27)	4(%25)	>0.05	12(%28.5)	8(%25.8)	>0.05
GC	22(%45.8)	7(%36.8)	1(%16.6)		6(%30)	11(%29.7)	5(%31.2)		14(%33.3)	11(%35.4)	
GG	16(%33.3)	4(%21)	4(%66.6)		9(%45)	16(%43.2)	7(%43.7)		16(%38)	12(%38.7)	

fazla olmamak kaydıyla) 73 bireylik grubumuzun %92'sini oluşturmaktadır ve %77.3'ü 4 yıllık sağkalım ve %96.2'si nakil sonrası rekürrensiz sağkalım sergilemişlerdir. Hastalarımızın hiçbirini, nakil sonrası kemoterapi veya radyoterapi almamışlardır. Nakilden 2 yıl sonra, 2 hastada (%2.7) tümör rekürrensi saptanmıştır. 2 hasta (%2.7), rekürrens gözlenmeden karsinom bağlantılı olmadan, biri nakilden 5 yıl sonra akut miyokard enfarktüsü sebebiyle, diğeri de nakilden 3 yıl sonra kolanjiosepsis sebebiyle ölmüştür. 73 bireylik hepatoselüler karsinom tanılı hastalarımızın 2'si karsinom dışı hastalıklardan mortal seyrettiği için, karsinoma bağlı sağkalım süresini verecek olan Kaplan Meier sağkalım analizi gerçekleştirilmesi uygun bulunmamıştır. Tümör rekürrensi, sadece 2 hastada baş gösterdiği için, yeterli sayıda hasta bulunmaması sebebiyle, VEGF temelli anjiogenez ile ortaya çıkan rekürrens ve VEGF gen polimorfizmi arasında bağlantı analizi gerçekleştirilmemiştir. VEGF geninin bu çalışmada araştırılan polimorfizmleri ile VEGF orijinli anjiogenezden türevlenen (şimdiye kadar yapılan çalışmalarda tartışmalı olsa da öyle düşünülen) rekürrens arasında bir bağlantı kurulmamıştır.

## TARTIŞMA

Hepatoselüler karsinom genelde kronik karaciğer hastalığı zemininde oluşan karaciğerin primer bir tümörüdür. Hepatoselüler karsinom dünyadaki 5. en sık görülen kanser olup, kanser ile ilişkili ölümlerde ise 3. sırada gelmektedir.<sup>10</sup> Hepatoselüler karsinom insidansı 65 yaş ve üstünde 1993 yılında 100.000 kişide 14 iken, 1999 yılında bu sayı 100.000 de 18.1 kişiye yükselmiştir.<sup>11</sup> Şimdiye kadar hepatoselüler karsinoma için hepatektomi en etkili tedavilerden biri olmasına rağmen,<sup>12</sup> nakil sonrası rekürrens yaygındır ve uzun dönemli iyileşme önünde temel engel olarak durmaktadır. Çoğu nakil merkezi ve United Network for Organ Sharing (UNOS) birlikte "Milan Kriterleri"ni oluşturmuşlardır. 1993'te Bismuth ve ark. retrospektif olarak rezeksiyon ve transplantasyonun sonuçlarını karşılaştırmış, 3 cm'den büyük olmayan, 2 nodülden fazla olmayan ve portal ven invazyonu olmayan küçük tümörlerde transplantasyon ile daha iyi bir hayatta kalıma sahip oldukları bildirilmiştir. 1996 yılında, Mazzaferro'nun bildirisine göre,<sup>13</sup> transplantasyon yapılmış 48 hastanın retrospektif analizinde, 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve 3 tümörden fazla olmayan hastalarda %75'i

4 yıllık sağkalım ve %83'ü rekürrensiz sağkalım sergilemişlerdir. Bu çalışmada ise 3 veya 5 cm'den büyük olmayan ve 3 tümörden fazla olmayan hastalar, çalışma grubunun %92'sini oluşturmaktadır.

Karakayalı ve ark.nın 2008 yılı çalışmaları ile korele olarak,<sup>14</sup> hastaların %77.3'ü 4 yıllık sağkalım ve %96.2'si nakil sonrası rekürrensiz sağkalım sergilemişlerdir. Karaciğer nakli yapılmış Türk hepatosellüler karsinom hastalarında gerçekleştirilmiş olan sağkalım analizlerinde, 2008 yılında, Kıyıcı ve ark.<sup>15</sup> Milan ölçütlerini aşan hepatosellüler karsinom hastalarında azalmış sağkalım oranları gözlemlenmiştir. Nakil sonrası ortalama hasta klinik izlemi 5.1887 +/- 1.9 (3-10) yıldır. Ortalama sağkalım süresi 9.518 ± ,268 yıl (Ortalama ± S.Sapma); (95% CI; 8.992-10.044) ve ortanca değer (medyan) 5 ± 1.8 olarak bulunmuştur. Gözlenen sağkalım süreleri: 1 yıllık %100, 3 yıllık %95 ve 5 yıldan fazla 10 yıla kadar %39.6 olarak gözlenmiş ve Haberal ve ark.nın 2007 yılı<sup>16,17</sup> çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur.

Hastalık gelişiminde anjiogenezin kritik olduğu çeşitli hastalıklar ve VEGF gen polimorfizmi arasında olası bağlantılar geçmiş çalışmalarda gösterilmiştir (Tablo 4), ancak şimdiye kadar Türk hepatosellüler karsinom hastalarında şüpheli gen

polimorfizmlerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Kore kadın popülasyonunda<sup>18</sup> endometrioz riski ile VEGF geni 5' UTR bölgesi -460 ve +405 polimorfizm incelemesinde, -460 C/T polimorfizmi hasta ve sağlıklılar arasında fark göstermemiş, +405 G/C polimorfizmi genotip dağılımı farklı iken, allel frekansları açısından fark gözlenmemiştir. Endometriozlu hastalarda +405 CC genotipi, sağlıklılarla karşılaştırıldığında yüksek insidansa sahip olarak görülmüştür.<sup>2</sup> Doğu Hindistan kadın popülasyonunda -460 C/T polimorfizmi risk olarak gözlenmemiştir.<sup>19</sup> +405 CC genotipinin +405 GG genotipine göre 3 kat daha fazla retinopati riski ve yüksek serum VEGF konsantrasyonu saptanmıştır.<sup>20,21</sup> VEGF geni UTR bölgesi polimorfizmlerinin protein üretimini nasıl etkilediği bilinmiyor olmasına rağmen, VEGF geni SNP'lerinin VEGF sentezi ile direkt ilişkili olduğu bildirilmiştir. +405 bölgesini kapsayan genetik polimorfizmler, kanser hücrelerindeki VEGF protein ekspresyonu ve tümör anjiogenik aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur.<sup>22</sup> Vaka kontrol çalışmalarında, VEGF polimorfizmleri ile kutanöz malign melanom,<sup>23</sup> kolorektal,<sup>24</sup> diabetik retinopati,<sup>25</sup> prostat kanseri,<sup>26</sup> göğüs kanseri<sup>27</sup> ve endometrioz<sup>2</sup> gibi hastalıklar arasında bağlantılar bildirilmiştir. Bununla beraber bağlantı saptanmayan çalışmalar da vardır. Gastrik

**TABLO 4:** VEGF +405 G/C, -460 C>T ve -141 A/C polimorfizmlerinin uluslararası çalışmalarda genotip-fenotip bağlantı analizi sonuçları.

Korelasyon Çalışması	Kaynak	Analiz edilen polimorfizmler	Vaka sayısı	Korelasyon varlığı	Korelasyon yokluğu
Kutanöz malign melanom	23	+405 G/C	152	√	
Endometriyoz (Güney Hindistan)	19	+405 G/C	215	√	
Endometriyoz (Kore)	18	+405 G/C	215	√	
Endometriyoz (Güney Hindistan)	19	-460 C>T	215		√
Endometriyoz (Kore)	18	-460 C>T	215		√
Endometriyoz (Çin)	30	-460 C>T	344	√	
Leiomyoma	31	-460 C>T	159	√	
Göğüs	27		1093		√
Prostat	20	-460 C>T	96	√	
Kolorektal	24	+405 G/C -460 C>T	302	√	
Gastrik	28	+405 G/C -460 C>T	503		√

kanser ve *VEGF* geni 5' UTR bölgesi -460 ve +405 polimorfizmleri arasında bağlantı gözlenmemiştir.<sup>28</sup> -460 T allel dağılımında çalışılmış olan 2 ayrı popülasyonda ciddi farklılıklar gözlenmiştir. +405G allelinin *VEGF* promotör aktivitesini arttırarak daha yüksek protein üretimine neden olması ile muhtemelen hastalığın gelişimi için (endometriosis) daha büyük bir olasılık olarak görülmesi söz konusu iken, +405C allelinin koruyucu etkileri olabileceği düşünülmüştür.<sup>19</sup> Liu ve ark. 2009 yılı çalışmalarında *VEGF*-460 C/T polimorfizmi ile popülasyonda endometriosis hastalığına yatkınlık arasında bir bağlantı gözlenmemiştir.

Kore'de 2007 yılında 416 hepatoselüler karsinom hastası üzerinde *VEGF* geninin -2578'den -1498 bölgesine değin 19 polimorfizm analiz edilmiş ve *VEGF* polimorfizmlerinin hepatoselüler karsinom hastalarında kayda değer prognostik indikatörler olduğu gözlenmiştir.<sup>29</sup> Bu noktada çeşitli çalışmalarda gözlenen bağlantı farklılıklarının, sebebi analiz edilen polimorfizmlerde gözlenen etnik varyasyon ve örneklem büyüklüğü olarak düşünülmektedir.

Hepatoselüler karsinomda genetik riske katkı sağlayan mekanizmalardan biri, anjiogenezde yer alan *VEGF* genidir. Ancak risk grubundaki insanlarda hepatoselüler karsinomun farklı frekans değerleri, poligenik bir yatkınlığı düşündürmektedir. Ancak genetik olarak heterojen insan popülasyonlarında, genetik varyantların tespiti son derece zordur.<sup>32</sup> Bununla birlikte, hepatoselüler karsinom patogeneğinde, modifiye edici ek genetik faktörlerin varlığı tartışılmaktadır. Bu faktörlerin farklı oranlardaki ekspresyonları, hepatokarsinogenez yatkınlığını ve hepatoselüler karsinom prognozunu etkileyebilmektedir. Bu noktada etnik köken dahilinde, daha büyük vaka-kontrol ve genotip-fe-

notip korelasyon analizlerini içeren retrospektif popülasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada *VEGF* geninin araştırılan polimorfizmleri ile *VEGF* orijinli anjiogenezden türetilen (şimdiye kadar yapılan çalışmalarda tartışmalı olsa da öyle düşünülen) rekürrens arasında bir bağlantı kurulmamıştır. Bununla birlikte, polimorfik allellerin portal ven invazyonu ve Milan ölçütleri ile uyumluluğunun gösterilebilmesi için daha büyük hasta gruplarına ihtiyaç duyulmaktadır. 73 bireyden oluşan Türk hepatoselüler karsinom hastalarında gerçekleştirilen ortotopik karaciğer nakli ve uzun dönem vaka takip süresince, sağkalım ve rekürrens analizleri ile karaciğer fonksiyon testleri göz önüne alınarak, canlı donör ve kadaverik donör nakillerinde birbirlerinden farklı sonuçlar elde edilmemiştir. Ortotopik karaciğer nakli, her iki verici tipinde de (canlı ve kadavra) kusursuz karaciğer fonksiyonu göstererek, Milan ölçütlerini aşan ve 'organ nakli'nden daha iyi bir tedavi seçeneği olmayan progresif lokal tümörlerde dahi (çalışma grubunun %8'i) uzun dönem sağkalım ve hastaliksız sağ-kalım sağlamıştır. Karaciğer naklinde, özellikle kadaverik vericinin bulunamadığı, kısıtlı süreçlerin olduğu ve bekleme listelerinin uzadığı acil durumlarda, canlı vericiler, hayat kurtarıcı öneme sahiptirler. Sonuç olarak, bu çalışma grubunda *VEGF* gen polimorfizmleri ile hepatoselüler karsinom riski arasında bağlantı gözlenmemiştir. Rekürrens anjiogenez öncülüğünde meydana geldiği düşünüldüğünde, anjiogenez oluşumunda etkin olduğu bilinen *VEGF* geninin etkileri, sadece 2 hastada rekürrens gözlenmesi dolayısıyla, *VEGF* geni orijinli olduğu düşünülen anjiogenezin, hepatoselüler karsinom patogeneğinde ve nakil sonrası prognozda tek başına etkin bir faktör olmadığını düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Bhosale P, Szklaruk J, Silverman PM. Current staging of hepatocellular carcinoma: imaging implications. *Cancer Imaging* 2006;6(1):83-94.
2. Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20(10):2904-8.
3. Filik L, Oğuz D. [Treatment of hepatocellular carcinoma]. *Güncel Gastroenteroloji* 2003; 7(1):74-9.
4. Bruix J, Llovet JM. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35(3):519-24.
5. Llovet JM, Bustamante J, Castells A, Vilana R, Ayuso Mdel C, Sala M, et al. Natural history of untreated nonsurgical hepatocellular carcinoma: rationale for the design and evaluation of therapeutic trials. *Hepatology* 1999;29(1):62-7.
6. Sturk C, Dumont D. Angiogenesis. In: Tan-nock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L, eds. *Basic Science of Oncology*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 231-48.
7. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):401-10.
8. Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, Merrill MJ, Zimonjic DB. Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet* 1996;97(6):794-7.
9. Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954;7(3):462-503.
10. Cole P, Morrison AS. Basic issues in population screening for cancer. *J Natl Cancer Inst* 1980;64(5):1263-72.
11. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: a population-based study. *Gastroenterology* 2004;127(5):1372-80.
12. Arai S, Yamaoka Y, Futagawa S, Inoue K, Kobayashi K, Kojiro M, et al. Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas: a retrospective and nationwide survey in Japan. *The Liver Cancer Study Group of Japan. Hepatology* 2000;32(6):1224-9.
13. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996;334(11):693-9.
14. Karakayali H, Sevmis S, Moray G, Yilmaz U, Ozcay F, Savas NA, et al. Liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: one center's experience. *Transplant Proc* 2008;40(1):213-8.
15. Kiyici M, Yilmaz M, Akylidiz M, Arkan C, Aydin U, Sigirli D, et al. Association between hepatitis B and hepatocellular carcinoma recurrence in patients undergoing liver transplantation. *Transplant Proc* 2008;40(5):1511-7.
16. Haberal M, Emiroglu R, Karakayali H, Moray G, Yilmaz U, Ozçay F, et al. Expanded criteria for hepatocellular carcinoma and liver transplantation. *Int Surg* 2007;92(2):110-5.
17. Haberal M. Liver transplantation: experience at our center. *Transplant Proc* 2006; 38(7):2111-6.
18. Kim SH, Choi YM, Choung SH, Jun JK, Kim JG, Moon SY. Vascular endothelial growth factor gene +405 C/G polymorphism is associated with susceptibility to advanced stage endometriosis. *Hum Reprod* 2005;20(10):2904-8.
19. Bhanoori M, Babu K, Reddy N, Rao KL, Zondervan K, Deenadayal M, et al. The vascular endothelial growth factor (VEGF) 1405G>C 5'-untranslated region polymorphism and increased risk of endometriosis in South Indian women: a case control study. *Hum Reprod* 2005;20(7):1844-9.
20. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51(5):1635-9.
21. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12(8):1232-5.
22. Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maltezos E, Sivridis E. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2004;46(3):293-8.
23. Howell WM, Bateman AC, Turner SJ, Collins A, Theaker JM. Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on tumour development in cutaneous malignant melanoma. *Genes Immun* 2002;3(4):229-32.
24. Maltese P, Canestrari E, Ruzzo A, Graziano F, Falcone A, Loupakis F, et al. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer disease in Italian population. *Int J Colorectal Dis* 2009;24(2):165-70.
25. Ray D, Mishra M, Ralph S, Read I, Davies R, Brenchley P. Association of the VEGF gene with proliferative diabetic retinopathy but not proteinuria in diabetes. *Diabetes* 2004;53(3):861-4.
26. Lin CC, Wu HC, Tsai FJ, Chen HY, Chen WC. Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology* 2003;62(2):374-7.
27. Kataoka N, Cai Q, Wen W, Shu XO, Jin F, Gao YT, et al. Population-based case-control study of VEGF gene polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(6):1148-52.
28. Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Cho YY, Bae HI, Yan G, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with gastric cancer. *Ann Oncol* 2007;18(6):1030-6.
29. Kong SY, Park JW, Lee JA, Park JE, Park KW, Hong EK, et al. Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2007;46(2):446-55.
30. Liu Q, Li Y, Zhao J, Sun DL, Duan YN, Wang N, et al. Association of polymorphisms -1154G/A and -2578C/A in the vascular endothelial growth factor gene with decreased risk of endometriosis in Chinese women. *Hum Reprod* 2009;24(10):2660-6.
31. Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, Yeh LS, Lin CC, Peng CT. T allele for VEGF gene-460 polymorphism at the 5'-untranslated region: association with a higher susceptibility to endometriosis. *J Reprod Med* 2004;49(6):468-72.
32. Akkız H. [Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma]. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3(34):32-7.