TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÜLSERATİF KOLİT HASTALARINDA SERUM VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) VE ENDOSTATİN DÜZEYLERİ İLE KOLON MUKOZA ÖRNEKLERİNDE VEGF VE ENDOSTATİN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Evrim KAHRAMANOĞLU AKSOY

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hülya ÇETİNKAYA

ANKARA
2009

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ÜLSERATİF KOLİT HASTALARINDA SERUM VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF) VE ENDOSTATİN DÜZEYLERİ İLE KOLON MUKOZA ÖRNEKLERİNDE VEGF VE ENDOSTATİN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Evrim KAHRAMANOĞLU AKSOY

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hülya ÇETİNKAYA

Bu tez Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu tarafından 20070809049HPD proje numarası ile ve Ankara Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından desteklenmiştir.

ANKARA
2009

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANELERİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanlığı

Kısım:.....
Dosya No:.....**Sayı:**.....
Konu:.....
.....

Ankara
/ /

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

"Ülseratif Kolit Hastalarında Serum Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Ve Endostatin Düzeyleri İle Kolon Mukoza Örneklerinde VEGF ve Endostatin Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi" başlıklı, Dr.Evrim Kahramanoğlu Aksoy' a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 14 / 04 / 2009

Prof.Dr.Necati ÖRMECİ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Hülya ÇETİNKAYA
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Gastroenteroloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

Prof.Dr.Murat TURGAY
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik İmmünoloji ve Romatoloji
Bilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

İhtisas eğitimim süresince, eğitim hayatıma olan katkılarından dolayı başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Necati Örmeci olmak üzere İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine,

Çalışma sürecinde her türlü kolaylığı gösteren, hastalarını benimle paylaşan, bilgi ve tecrübelerini aktaran değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Hülya Çetinkaya'ya,

Tezimin gerçekleşmesinde büyük emekleri olan Prof. Dr. Arzu Ensari, Doç. Dr. Berna Savaş ve Doç. Dr. Hüseyin Tutkak'a,

Endoskopi ve İmmünoloji Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına,

İstatistiklerimi yapmama yardımcı olan Zeynep Bıyıklı'ya,

ve tezimi finansal açıdan destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Müdürlüğü'ne ve Ankara Üniversitesi İç Hastaıkları Anabilim Dalı'na teşekkür ederim.

Dr. Evrim KAHRAMANOĞLU AKSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

TABLOLAR DİZİNİ viii

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Ülseratif Kolit 3

2.1.1. Patogenez 3

2.1.2. Patoloji 5

2.1.3. Klinik Bulgular 6

2.1.4. Laboratuvar Bulguları 8

2.1.5. Tanı 8

2.1.6. Tedavi 9

2.2. Normal Anjiogenez 10

2.3. Anjiogenez Kontrol Mekanizmaları 11

2.4. Anjiogenezi Uyaran Faktörler 12

2.4.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü 12

2.4.1.1. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve İnflamatuvar Barsak Hastalığı 15

2.4.2. Fibroblast Büyüme Faktörü 15

2.4.3. Trombosit Kaynaklı Endotelyal Büyüme Faktörü 16
2.4.4. Diğer Faktörler 16
2.5. Anjiogenezi Önleyen Faktörler 17
2.5.1. Endostatin 17
2.5.5.1. Endostatin ve İnflamatuvar Barsak Hastalığı 18
2.6. Ülseratif Kolit ve Anjiogenez 18
2.7. Anjiogenez ve Yara İyileşmesi 22
3. HASTALAR VE YÖNTEM 23
3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi 23
3.2. Serum VEGF ve Endostatin Düzeylerinin Ölçümü 25
3.3. İmmünhistokimyasal Boyama 25
3.4. İstatistiksel Yöntemler 27
4. BULGULAR 29
5. TARTIŞMA 41
6. SONUÇ 46
7. ÖZET 48
8. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY) 50
9. KAYNAKLAR 52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha_4\beta_1$ integrin : alfa 4 beta 1 integrin

Ang-1,2 : Anjiogenin 1,2

APC : Antijen sunan hücre

bFGF : Bazik fibroblast büyüme faktörü

5-ASA : 5-aminosalisilik asit

CRP : C reaktif protein

EAİ : Endoskopik aktivite indeksi

ESH : Eritrosit sedimentasyon hızı

EGF : Epidermal büyüme faktörü

flt-1,-4 : fms benzeri tirozin kinaz-1,-4

Gro-1 : Büyüme düzenleyici onkogen-1

HGF : Hepatosit büyüme faktörü

HIF-1 : Hipoksi ile indüklenen faktör-1

İBH : İnflamatuvar barsak hastalığı

İBS : İrritabl barsak sendromu

IFNγ : İnterferon gama

IL : İnterlökin

IL-1ra : İnterlökin 1 reseptör antagonisti

ICAM-1 : İnterselüler adezyon molekülü-1

KDR/ flk-1 : Kinaz sahası içeren reseptör/fetal liver kinaz

LTB4 : Lökotrien B4

MadCAM-1 : Mukozal hücre adezyon molekülü-1

MDR1 : Multidrug rezistan 1

MMPs : Matriks metalloproteinazları

MMCP-1 : Monosit kemoatraktan protein-1

NOD : Nucleotid bağlayan oligomerizasyon içeren saha

PAMP : Patojen ilişkili moleküler paternler

PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

PECAM-1 : Trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü-1

PIGF-1 : Plasenta kaynaklı büyüme faktörü-1

PGE2 : Prostaglandin E2

TGF-β : Transforme edici büyüme faktörü

Th1 : T helper 1

Th2 : T helper 2

Th3 : T helper 3

TIMP-1 : Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1

TLR : Toll benzeri reseptör

TNF-α : Tümör nekrozis faktör alfa

TxA2 : Tromboksan A2

Tr1 : T regülatör lenfosit 1

ÜK : Ülseratif kolit

ÜKAİ : Ülseratif kolit aktivite indeksi

VCAM-1 : Vasküler hücre adezyon molekülü-1

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VEGFR : Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

1.1. Antijenik uyarı sonrası intestinal immünitenin farklı reaksiyonları 4

2.1. Fizyolojik anjiogenez mekanizmaları..... 11

2.2. VEGF izoform-reseptör ilişkisi ve etki mekanizmaları 14

2.3. İnflamatuvar hücrelerden anjiogenik mediyatörlerin salınımı 20

2.4. İBH ilişkili anjiogenezde adezyon molekülleri, reseptörler, kemokinler, sitokinler ve diğer anjiogenik mediyatörler 21

4.1. Çalışma hastalarında ortanca serum VEGF düzeyleri 31

4.2. Çalışma hastalarında ortanca serum endostatin düzeyleri 31

4.3. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ile boyanma şiddeti 35

4.4. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ile boyanma yaygınlığı 36

4.5. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ile boyanma şiddeti..... 37

4.6. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ile boyanma yaygınlığı..... 38

4.7. ÜK hastalarının aktif ve inaktif kolon mukozalarının hematoksilen eozin boyası ile gösterilmesi 39

4.8. ÜK hastalarının kolon mukozalarında immünhistokimya yöntemi ile VEGF ve endostatin ekspresyonları 40

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

3.1. ÜK için Seo klinik aktivite indeksi 24

3.2. İBS için Roma III Kriterleri 24

3.3. Rachmilewitz endoskopik aktivite indeksi (EAİ) 25

4.1. Çalışma hastalarına ait demografik ve klinik özellikler 29

4.2. ÜK hastalarında serum örneklemesi sırasında kullanılan ilaç çeşitleri 30

4.3. Çalışma hastalarında serum VEGF ve serum endostatin düzeyleri 30

4.4. ÜK hastalarında klinik aktivite şiddetine göre serum VEGF ve endostatin düzeylerinin karşılaştırılması 32

4.5. ÜK hastalarında hastalık bölgesine göre serum VEGF ve serum endostatin düzeyleri 33

4.6. ÜK hastalarında serum VEGF, serum endostatin, ÜKAİ, EAİ, akut faz reaktanları arasında lineer korelasyon katsayıları 33

4.7. ÜK hastalarına ait aktif mukoza, inaktif mukoza ile İBS hastasına ait normal mukoza örneklerinde ortalama VEGF ekspresyon değerleri 34

4.8. ÜK hastasına ait aktif mukoza, inaktif mukoza ile İBS hastasına ait normal mukoza örneklerinde ortalama endostatin ekspresyon değerleri 37

1. GİRİŞ

Ülseratif Kolit (ÜK); kolon ve rektum mukozasının inflamasyon, ülserasyon ve rejenerasyonu ile karakterize etiyolojisi bilinmeyen intestinal ve ekstraintestinal semptomlar gösteren alevlenme ve iyileşme dönemlerinin birbirini izlediği kronik inflamatuvar barsak hastalığıdır (İBH).

Anjiogenez; önceden var olan damarlardan yeni kapiller oluşumu anlamına gelmektedir. Anjiogenezin embriyogenez, doku büyümesi, yara iyileşmesi gibi fizyolojik olayların yanı sıra kanser biyolojisinde, ateroskleroz, romatoid artrit, diabetik retinopati, psöriazis, hava yolu inflamasyonu, peptik ülser ve Alzheimer hastalığı gibi birçok kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalığın patogenezinde rol aldığı saptanmıştır. Kolon mukozasının devamlı olarak ülserasyonu ve rejenerasyonu ile karakterize ÜK hastalarında rejenerasyon sahasına besin ve oksijen temini, artık ürünlerin uzaklaştırılmasına katkısından dolayı anjiogenez beklenmektedir. Son dönemdeki çalışmalar İBH'da anjiogenezi aktive eden faktörlerin arttığını göstermektedir. İBH'da erken dönemde fizyolojik olan anjiogenez, immün anormalliklere, anjiogenezi uyaran ve önleyen faktörlerin anormal ekspresyonuna bağlı olarak patolojik sürece katkıda bulunuyor gibi gözükmektedir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF); en etkili endotel spesifik anjiogenik büyüme faktörüdür, doku hasarı ve ülser iyileşmesinde önemli rol oynar. Klinik ve deneysel çalışmalar; aktif ÜK hastalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında serum ve doku VEGF düzeyinin arttığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda deneysel duodenal ülserlerde rekombinan VEGF proteininin ülser iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Yine deneysel duodenal, gastrik ülserlerde ve ÜK'de VEGF gen tedavisinin iyileşmeyi hızlandırdığı saptanmıştır. VEGF ekspresyonundaki artışa rağmen ÜK ilişkili mukoza hasarındaki iyileşmenin neden bozulduğu açıklanamamıştır. Anjiogenez inhibitörlerinin aktivasyonunun VEGF'nin anjiogenik etkisini bloke edebileceği deneysel kolit modelinde gösterilmiştir.

Endostatin kollajen XVIII'in karboksiterminal kısmının 20 kDa ağırlığındaki parçasıdır. Endostatinin endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü engelleyerek, endotel hücrelerinin apoptozisini indükleyerek anjiogenezi inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda endostatin tedavisinin yara iyileşmesini ve granülasyon dokusu oluşumunu geciktirdiği gözlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı ÜK hastalarında serum VEGF ve endostatin düzeylerinin ölçümü, hastalık aktivitesi ve birbirleri ile olan ilişkisinin saptanması, kolon mukoza örneklerinde VEGF ve endostatin ekspresyonlarının değerlendirilmesi ve elde edilen verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ülseratif Kolit

ÜK, İBH'nın büyük bir kısmını oluşturan kolon ve rektum mukozasının inflamasyon, ülserasyon ve rejenerasyonu ile karakterize, alevlenme ve iyileşme atakları ile seyreden kronik inflamatuvar bir hastalıktır. İnflamatuvar cevap genellikle mukoza ve submukozaya sınırlıdır. Rektumdan başlayarak hastalık yapar. %95 olguda rektum tutulumu mevcuttur. Kolon tutulumuna göre proktosigmoidit, sol kolon koliti ve pankolit olarak ayrılır. İleoçekal valvin hastalığına bağlı olarak 'backwash ileiti' ortaya çıkabilir. Hastaların 1/3'ü pankolit olup %30-40'ı rektosimoid bölgeye sınırlıdır.

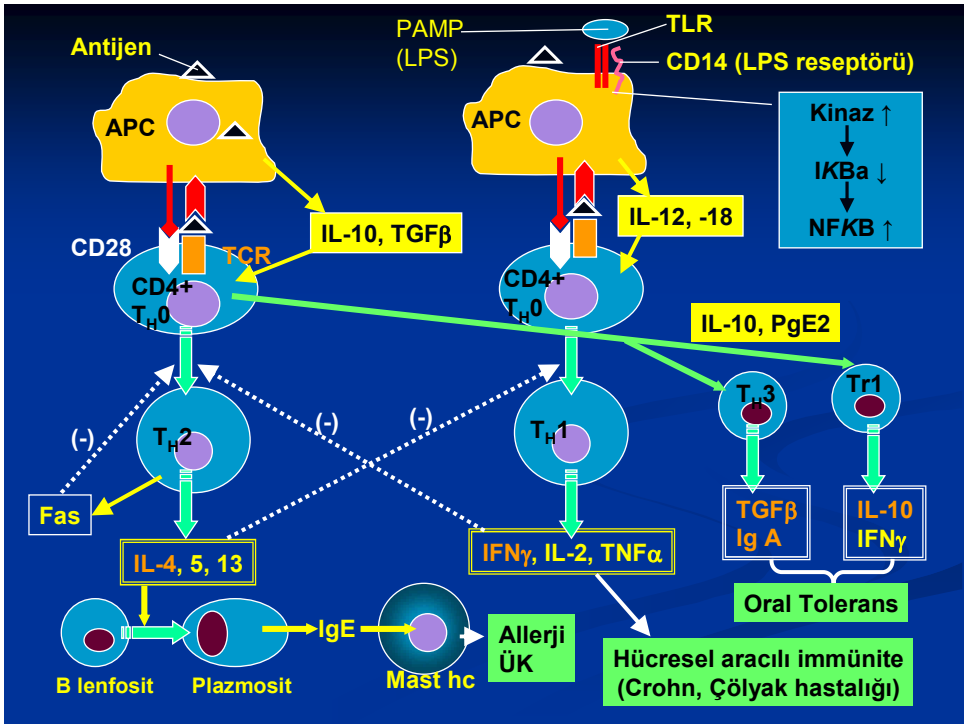
Prevelansı 20-130/100.000, insidansı 1.3-15.1/100.000 civarındadır. Beyazlarda, Yahudi ırkında, sosyoekonomik düzeyi yüksek olanlarda, şehirde yaşayanlarda daha sık gözükmektedir. Hastalığın en sık görüldüğü yaş dönemi 2-3. dekattır. İkinci pik ise 6-7. dekatta olmaktadır.[1-3] Etiyoloji tam olarak bilinmemekle birlikte genetik, çevresel ve konakçı immün cevabı gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır. En önemli risk faktörü pozitif aile hikayesidir.[4] Hastaların yaklaşık %15'inin birinci derece akrabaları etkilenmiştir. İnsidans monozigot ikizlerde artmıştır.[5]

2.1.1. Patogenez

ÜK'de hastalık mekanizmasını tetikleyen olaylar çok çeşitlidir. Luminal ajanlar ve enfeksiyöz toksinler mukozal bariyeri geçerek genetik olarak hassas kişilerde inflamasyonu başlatırlar. Mukozal ülserasyon ve erozyon, goblet hücrelerinin azalması, mukoza ve submukozada ödem, mukoza ve submukozada inflamatuvar hücre infiltrasyonu akut dönemde görülen bulgulardır.[3]

İBH'da temel patofizyolojik mekanizmanın, T helper 1 (Th1) ve T helper 2 (Th2) lenfositlerinin aktivasyonunda bir bozukluk ya da proinflamatuvar sitokinler (IL-1 [interlökin 1], IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α [tümör nekrozis faktör alfa], IFNγ [interferon gama], TxA2 [tromboksan A2],

LTB4 [lökotrien B4]) ile antiinflamatuvar sitokinler (IL-1ra [interlökin 1 reseptör antagonisti], TNF bağlayan proteinler, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, PGE2 [prostaglandin E2]) arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Crohn hastalığında aşırı Th1 yanıtı, ÜK'te anormal Th2 yanıtı vardır. Crohn hastalığında Th1 lenfositleri aktive olur ve IL-2 ve IFNγ yapımını sağlar. ÜK'te ise Th2 sitokinleri olan IL-4, IL-5, IL-13 artar.[3]



Şekil 1.1. Antijenik uyarı sonrası intestinal immünitenin farklı reaksyonları. Probert ve ark.'dan adapte edilmiştir.[6]

Antijen sunan hücre (APC) membranındaki Toll benzeri reseptörler (TLR) bakteri ürünlerinin (lipopolisakkarit, flagellin gibi PAMP [patojen ilişkili moleküler paternler] molekülleri) patojen ya da non-patojen olduğunu ayırt etmektedir. Bakteriyel ürünlerden lipopolisakkaritler (LPS) antijenle birlikte APC'lere sunulduğu zaman TLR'ler aracılığıyla Th1 aktivasyonu ve inflamasyon gelişmektedir. Antijenle birlikte bakteri ürünü olmaması halinde Th2 aktive olur ve humoral immün yanıt gelişir (Şekil 1.1).[6,7]

Oral yolla alınan antijenlere karşı sistemik immünolojik cevabın oluşturulamamasına oral tolerans adı verilir. İntraepitelyal CD4+ T lenfositler

oral toleransın başlamasında anahtar role sahiptir.[6] Yaş, genetik, daha önceki immün yanıtlar, antijenin yapısı, miktarı, antijenle karşılaşma süresi oral toleransın gelişimini etkiler. Aktive CD4+ lenfositlerden açığa çıkan Fas, T lenfositlerin apoptozuna neden olmaktadır. Kalan T lenfositlerin bir kısmı da Tr1'e (T regülatör lenfosit) ve Th3'e dönüşür. Bu lenfositlerden salınan düzenleyici sitokinler de aktive T lenfositleri baskılamakta, oral toleransın gelişimine katkıda bulunmaktadır.

NF*K*B (nükleer faktör kapa B) makrofaj aktivasyonunda önemli göreve sahiptir. Bakteri polimerleri ve proinflamatuvar mediatörlerin membran reseptörlerine bağlanmasını sağlar. TLR aktivasyonu sonucu hücre içinde çeşitli kinazlar aktive olur. Temel transkripsiyon faktörü olan NF*K*B' nin inhibitörü olan I*K*Ba aktive kinazlarca yıkılarak NF*K*B serbest kalır ve nukleusa geçer. Nukleusa geçen NF*K*B çeşitli proinflamatuvar moleküllerin (sitokinler, adezyon molekülleri, enzimler ve HLA classs II molekülleri) gen promoter bölgelerine bağlanarak transkripsiyonu başlatır, inflamatuvar olayın aktif kalmasına neden olur.[7]

İBH karmaşık genetik model grubunda bulunan bir hastalıktır. NOD1 (Nucleotid bağlayan oligomerizasyon içeren saha 1), NOD2, TLR-4 (Toll-benzeri reseptör 4), MDR1 (multidrug rezistan-1), HLA DRB1*103 bu konuda adı geçen genlerdir.[3]

Sonuç olarak ÜK genetik, enfeksiyöz ve immünolojik faktörlerin tetiklediği kronik inflamatuvar bir hastalıktır.

2.1.2. Patoloji

ÜK, akut ve ağır hastalık dışında sadece mukoza ile sınırlıdır. Ancak ağır hastalık durumlarında hastalık transmural olabilir. Aktif ÜK mukoza ve submukozadaki nötrofiller ve kript lümenindeki nötrofil kümeleri (kript abseleri) ile belirgindir. Kript abseleri ÜK'yi Crohn hastalığından ayıran en önemli özelliklerdendir. Aktif dönemde kolon mukozası hiperemik,

konjesyonlu ve granüler görünümdedir. Vaskülaritesi artmıştır ve en ufak temasla kanar. Goblet hücre kaybı vardır.

Kronik hastalık döneminde lümen içerisine doğru yerleşen mukoza rejenerasyonu ve proliferasyonundan kaynaklanan polip benzeri yapılar vardır. Bunlar psödopolip olarak adlandırılır. Psödopolipler ÜK'in lokal komplikasyonlarıdır. Hafif şiddetli hastalıkta yüzeyel ülserasyonlar vardır, daha şiddetli hastalıkta ülserler daha geniştir ancak yüzeyeldir. Muskularis mukozanın penetrasyonu ise genelde çok ağır hastalıkta olur. Uzun süreli hastalıkta kolon mukozasında displastik değişiklikler görülebilir. Bu durum kolon kanseri gelişimi açısından önemlidir.[8-10]

2.1.3. Klinik Bulgular

ÜK remisyon ve alevlenmelerle giden kronik intermittan tip, devamlı hafif aktivasyon bulguları ile karakterize kronik devamlı tip ve şiddetli tek bir hastalık ile karakterize akut fulminan tip olmak üzere üç tip klinik ile karşımıza çıkar.

Hafif şiddette hastalığı olanların %90'ından fazlası ilk ataktan sonra remisyona girer.[11]

ÜK'deki öncelikli semptom kanlı ve mukuslu diyaredir. Fekal inkontinans ve acil defekasyon yapma isteği hastanın yaşamında sıkıntılar oluşturur. Kolonun tamamı ya da tamamına yakını tutulanlarda ateş, halsizlik, kilo kaybı ve alt kadranda görülen karın ağrısı gibi sistemik bulgular daha sık görülebilir. Sadece rektum tutulumu olanlarda ise rektal kanama, acil defekasyon yapma isteği, tenezm ve nadir olarak da karın ağrısı görülebilir. Ağır şiddette atak geçirenlerin genel durumları iyi değildir, karında distansiyon, timpanizm, barsak seslerinde azalma görülebilir. Sıvı kaybı, elektrolit imbalansı, özellikle hipokalemi ciddi sorunlar oluşturabilir. Anemi, lökositoz ve eritrosit sedimentasyon hızında artma ağır şiddetteki hastalığın durumunun tespitinde ve ağır alevlenmenin klinik seyrini takip etmede yararlıdır. ÜK'nin aktivite derecesinin belirlenmesi için ''Truelove- Witts'',

‘’Seo’’, ‘’Rachmilewitz Klinik ve Endoskopik İndeksi’’nden yararlanılmaktadır.[12-14]

ÜK, primer olarak kolonu tutabildiği gibi, diğer organ sistemlerindeki bulgular ile de beraber olabilir. Ekstraintestinal bulguların bir kısmı hastalık aktivitesi ile ilişkilidir, diğer bir kısmı ise hastalık aktivitesi ile ilişkili değildir.[15]

ÜK’nin en sık görülen ekstraintestinal bulgusu artrit ve ankilozan spondilittir. ÜK’de genel populasyona oranla ankilozan spondilit gelişme riski 30 kat daha fazladır. Kas ve iskelet sistemindeki diğer bulgular; periostit, osteoporoz, aseptik nekroz, çomak parmak ve polimiyozittir.[16]

Hepatobiliyer sistemde, primer sklerozan kolanjit, hepatosteatoz, perikolanjit, kronik aktif hepatit, portal fibrozis, siroz, kolanjiokarsinom, granülom, hepatik vasküler anormallikler ve safra taşları görülebilir. ÜK’nin en sık görülen hepatik komplikasyonu perikolanjittir. Perikolanjitli hastalar genellikle asemptomatiktir. Alkalen fosfataz yüksekliği ve billirubin yüksekliği görülebilir.

ÜK’nin en sık görülen dermal lezyonları, piyoderma gangrenosum ve eritema nodosumdur. Daha nadir görülen diğer dermal lezyonlar; nekrotizan vaskülit, aftöz ülserler, vezikülopüstüler erupsiyon, fissür, purpura, alopesi, tırnakta harabiyet, akrodermatitis enteropatika, glossit, vitiligo, psöriazis, sweet sendromu ve tedavide kullanılan ilaçlara bağlı erupsiyondur.[17]

ÜK’de oküler tutulum olarak en sık üveit ve episklerit başta olmak üzere skleromalazi, retinal vasküler hastalıklar, katarakt, gece körlüğü ve korneal ülser görülebilir.

Renal ve genitoüriner sistemde hidronefroz, nefrotik sendrom, üreter obstrüksiyonu, enterovezikal ve enterovajinal fistüller, tubulointerstisyel nefrit, böbrek taşları, amiloidoz ve glomerulonefrit görülebilir.[18]

ÜK’de ayrıca akut pankreatit, bronşiolit, akut laringeotrakeit, pulmoner fibrozis, tromboflebit, tromboembolik olaylar, trombositopenik purpura, arteriyel oklüzyonlar, perikardit, çocuklarda gelişme geriliği, miyelopati,

myastenia gravis, serebrovasküler bozukluklar ve periferik nöropati de görülebilir.

2.1.4. Laboratuvar Bulguları

Ağır şiddetli hastalıkta anemi, hipoalbuminemi, hipergammaglobulinemi ve hipokalemi görülebilir.[11,19] Eritrosit sedimentasyon hızında artma, trombositoz, lökositoz, C-reaktif protein (CRP), fibrinojen ve ferritin gibi akut faz reaktanlarında artış, hastalığın aktivite derecesini göstermede önemli parametrelerdir. ÜK hastalarının büyük bir kısmında hastalığın herhangi bir döneminde karaciğer enzimleri yüksek saptanır. Ağır ataklarda alkalen fosfataz ve aspartat transaminaz yüksekliği daha belirgindir, atak düzelince genelde bu değerler de normale gelir. Ancak bu enzimlerin daha uzun süre yüksek kaldığı durumlarda primer sklerozan kolanjit akla gelmelidir.[8] Gaita örneğinin mikroskobisinde eozinofiller, eritrositler ve inflamatuvar hücreler görülebilir. Özellikle alevlenen hastalıkta amip enfeksiyonu araştırılmalıdır. Salmonella, Shigella, Yersinia, E. coli, Clostridium difficile ve Campylobacter için gaita kültürü yapılmalıdır. Ayrıca Clostridium difficile toksini toksin-A da araştırılmalıdır.[20]

2.1.5. Tanı

Tanı yöntemleri, hastalığın yaygınlığını, aktivitesini ve spesifik komplikasyonlarını belirlemek için kullanılır. İyi bir anamnez ve fizik muayeneden sonra gaita tetkiki, biyokimyasal testler, gastrointestinal sistemin endoskopik muayenesi ve histopatolojik değerlendirme ile tanı konulmalıdır. Gerektiğinde radyolojik incelemeler, ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi ve magnetik rezonans görüntüleme de yapılmalıdır. Bu tetkikler arasında ÜK tanısı için en değerli tanı aracı kolonoskopi ve işlem sırasında alınan biyopsi örneklerinin histopatolojik incelemesidir.

2.1.6. Tedavi

Tedavideki amaç; semptomatik iyileşmenin sağlanması, inflamasyonun azaltılması, hastanın beslenmesinin düzeltilmesi ile remisyonun ve devamlılığının sağlanmasıdır. Tedavi planlanırken, hastalığın anatomik lokalizasyonu, aktivitesi, hastalık süresi, hastanın tolerabilitesi ve hastalığın daha önce uygulanan tedavilere verdiği yanıt da göz önünde bulundurulmalıdır.

ÜK'te tedavi seçimi hastalığın yaygınlığı ve şiddetine göre yapılır. Aktif ülseratif proktitli ve sol kolon tutulumlu hastalarda tedavi, gece uygulanan 5-ASA (5-aminosalisilik asit) lavman veya fitillerinin verilmesidir. Kortikosteroid lavmanları da kullanılabilir. 5-ASA veya kortikosteroid lavmanları distal kolonun 60 cm'ye kadar tutulan hastalığında faydalıdırlar. Her ikisi beraber de kullanılabilir. Tedavide bir diğer yaklaşım da lavmanlarla beraber oral 5-ASA preparatlarının (2-4 gram/gün) kullanılmasıdır. Hafif veya orta şiddette yaygın kolitli hastalarda tedaviye oral 5-ASA preparatları (2-4 gram/gün) veya sulfasalazin (3-6 gram/gün) ile başlanabilir. Bu tedaviye 3-4 hafta içinde yanıt alınamadığı zaman oral kortikosteroid (40 mg/gün prednizon) başlanmalıdır. Çoğu hasta oral prednizona birkaç gün içinde yanıt verir. Semptomlar kontrol altına alındıktan sonra, prednizon kademeli bir şekilde 1-2 haftada bir doz 5-10 mg azaltılarak kesilmelidir. Oral steroid tedavisi kesilen hastalarda tedaviye oral 5-ASA ile devam edilmelidir. Eğer steroidlere yanıt alınamazsa veya steroid kesildikten sonra hastalıkta tekrar alevlenme görülürse tedaviye bir immünsupresif ajan (azatiopürin 1,5-2,5 mg/kg/gün veya 6-merkaptopürin 1,5mg/kg/gün) eklenmelidir. İmmünsupresif ajanlardan da yanıt alınamazsa kolektomi düşünülmelidir.[21]

Ağır veya fulminan pankolitli hastalar hastanede yatırılarak tedavi edilmelidirler. Bu hastalara intravenöz kortikosteroid (hidrokortizon 300 mg/gün, metilprednizon 45-60 mg/gün veya prednizon 60-80 mg/gün) tedavisi başlanmalıdır. Eğer malnütrisyon varsa total parenteral nutrisyon gerekebilir. Tedaviye 7-10 gün içinde yanıt alınamayan hastalarda intravenöz

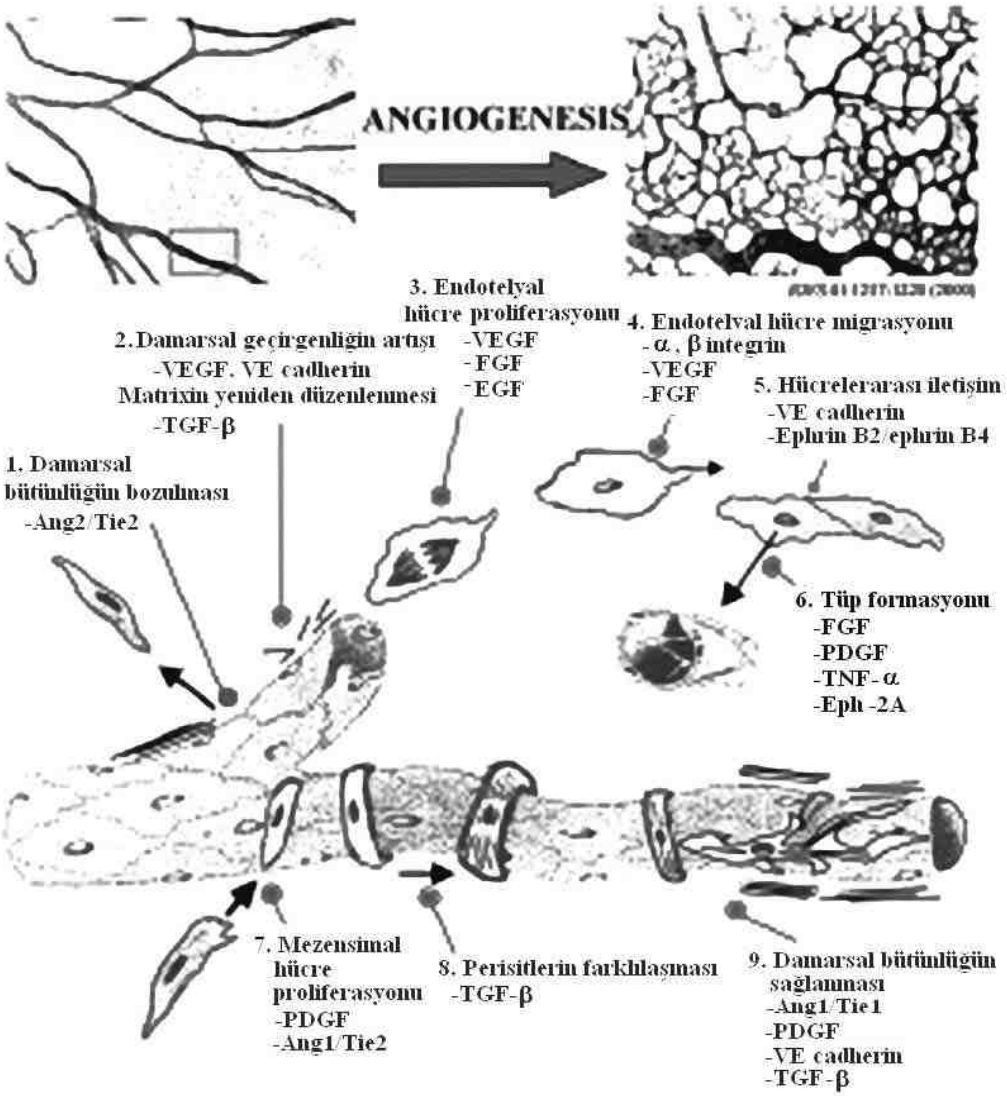
siklosporin (1-3 mg/kg/gün) başlanabilir. Eğer yine yanıt alınamazsa kolektomi için cerrahiye verilmelidir. Ağır aktif ÜK olan hastalarda toksik megakolon olabileceği düşünülmelidir. Antikolinerjik ve antidiyareik ilaçlar toksik megakolon geliştirme riskinden dolayı ağır ÜK'li hastalarda kontrendikedir.[22, 23]

Aktif ÜK olan bir hastada akut alevlenme, hastalığın seyri dışında amebiazis, Clostridium difficile koliti veya sitomegalovirus koliti gibi bir nedene de bağlı olabilir. Özellikle amebiazis İBH'li hastalarda yüksek oranda görülmektedir. Amip enfeksiyonu ÜK'li hastalarda daha fazla görülür. Hastaların yaklaşık yarısında amip enfeksiyonu ilk başvuruda saptanmaktadır. Bu durum tanıyı geciktirmekte ve zorlaştırmaktadır.

ÜK tedavisinde hemen hemen bütün hastalar idame tedavisi almalıdırlar. Oral 5-ASA ve sülfasalazin ile idame tedavi ÜK'li hastalarda nüks insidansını azaltır. Kortikosteroidlerin idame tedavide yeri yoktur. İdame tedaviye rağmen yılda iki veya daha fazla atak geçiren hastalarda, uzun etkili immünsupresif ilaçlardan (azatiopürin, 6-merkaptopürin ve metotreksat) biri tedaviye eklenebilir.[24-26]

2.2. Normal Anjiogenez

Vasküler sistem, embriyonal dönemde endotelyal hücre öncüsü olan anjioblastlardan vaskülogenez sonucu gelişen primer kapiller ağın farklılaşması ile oluşmaktadır. Vaskülogenezde anjioblastlar çoğalırlar ve primer kapiller ağı oluşturmak için biraraya gelirler. Oluşan bu endotelyal hücre ağı, anjiogenez sırasında yeniden şekillendirilip, genişletilerek yeni damarların oluşumu için temel olarak kullanılır (Şekil 2.1).[27] Fizyolojik koşullar altında anjiogenez, sadece büyüyen ya da yenilenen dokuların artan metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için aktif hale gelmektedir.



Şekil 2.1. Fizyolojik anjiogenez mekanizmaları.
Papetti ve ark.'dan adapte edilmiştir.[32]
VEGF:Vaskülar Endotelyal büyüme faktörü, TGF-β:Transforme edici büyüme Faktörü beta, FGF:Fibroblast büyüme faktörü, EGF: Epitelyal büyüme faktörü, Eph-2: Efrin-2, TNF-α: Tümör nekrozis faktör alfa, PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü; Ang-1 ve -2/Tie2: Anjiogenin-1 ve -2/ Tie reseptörü.

2.3. Anjiogenez Kontrol Mekanizmaları

Anjiogenez, anjiogenezi uyaran ve önleyen çok sayıda faktör tarafından kontrol edilen, son derece karmaşık ve dinamik bir olaydır. Anjiogenez mediyatörleri büyüme faktörlerini, sitokinleri, kemokinleri, adezyon moleküllerini, proteinazları, ekstraselüler matrix bileşenlerini

içerirler.[28] Bunlar içerisinde göze çarpanlar; VEGF, PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü), bFGF (bazik fibroblast büyüme faktörü), HGF (hepatosit büyüme faktörü), anjiogenin, anjiopoietinler (Ang-1, Ang-2), MMPs (metalloproteinazlar) ve inhibitörleri, adezyon molekülleri (CD146), TGF-β (transforme edici büyüme faktörü beta), integrinler ve kemokinler bulunur.

2.4. Anjiogenezi Uyaran Faktörler

2.4.1.Vaskülar Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF bilinen en etkili anjiogenezi uyarıcı faktörlerden biridir ve anjiogenezin kontrolünde önemli rol oynar. Anjiogenezi ve lenfanjiogenezi uyarıcı büyüme faktörlerini kodlayan VEGF gen ailesi tarafından altı farklı glikoprotein kodlanmaktadır: VEGF-A,B,C,D,E ve plasental büyüme faktörü-1 (PlGF-1).[29,30]

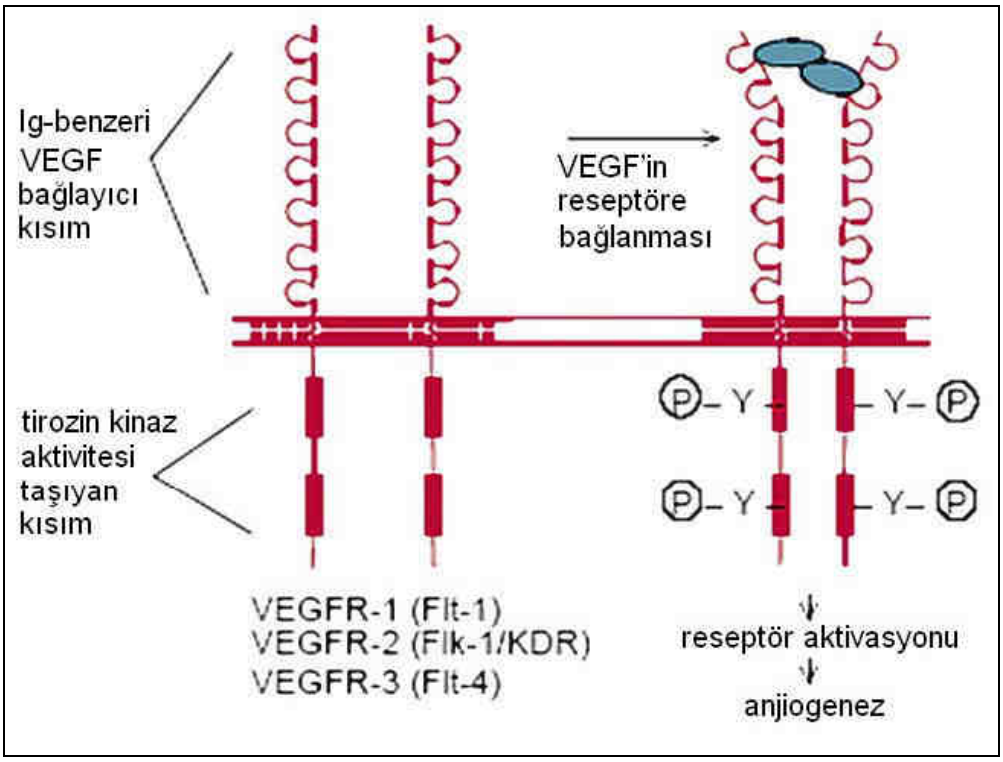
VEGF-A ilk kez Dvorak ve ark. tarafından tümör hücrelerinden salgılanan vasküler geçirgenliği artırıcı faktör olarak tanımlanmıştır.[31] Daha sonra Ferrara ve ark. VEGF-A'yı endotelyal hücrelere spesifik bir mitojen olarak izole etmişlerdir.[32] VEGF; 45-kDa molekül ağırlığında, birden fazla anjiogenezi uyarıcı etkisi olan homodimerik bir glikoproteindir. VEGF-A mRNA'sının farklı kodlanması ile aminoasit içerik ve sayıları farklı olan 5 izoform sentezlenir: VEGF-121,145, 165, 189 ve 206.[30] Kısa aminoasit zinciri içeren izoformlar (VEGF-121 ve -145) hücre dışına salgılanıp serumda serbest formda bulunurken, daha uzun amino asit zinciri içeren izoformlar (VEGF-189 ve VEGF-206) hücre dışı matriks içerisinde yer alırlar. Proteolitik enzim reaksiyonları sonrasında aktif hale gelirler.[33] Baskın form olan ve pek çok solid tümörde artışı saptanan VEGF-165 ise hem serumda serbest formda hem de hücre dışı matriks proteinlerine bağlı olarak bulunur. Yapılan araştırmalar belirli VEGF izoformlarının doku spesifik olduğunu, vaskülogenezde ve tümör anjiogenezinde etkin rol oynadıklarını göstermiştir.[34,35] VEGF embriyonal gelişim süresince aktif olan fizyolojik vaskülogenez yanında, postnatal dönemde yara iyileşmesi, ovülasyon,

menstruasyon, kan basıncının regülasyonu ve gebelik gibi pek çok olayda da anjiogenezin kontrolünde etkin rol oynamaktadır.[36,37] Ayrıca artirit, psöriazis, maküler dejenerasyon, diyabetik retinopati ve tümör gibi patolojik anjiogenezin görüldüğü durumlarda da VEGF ekspresyonunda artış olduğu tespit edilmiştir.[38]

VEGF ailesine dahil olan moleküller farklı reseptörler aracılığı ile anjiogenik etkilerini göstermektedirler. VEGF'nin bağlandığı 3 farklı tirozin kinaz reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (fms benzeri tirozin kinaz-1; flt-1), VEGFR-2 (kinaz içeren reseptör/fetal liver kinaz;KDR/Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4). Bu reseptörler endotel hücrelerine özel olmayıp, vasküler düz kas hücrelerinde ve monosit/makrofajlarda da bulunmaktadır (Şekil 2).[27,39]

VEGFR-1, VEGF bağlama potansiyeli en yüksek olan reseptör olmasına rağmen endotel hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu uyarıcı etkisi yoktur. VEGF bağlama potansiyeli daha düşük olan VEGFR-2 reseptörüne VEGF'nin bağlanması ile endotel hücrelerinde mitogenez, kemotaksis ve şekil değişiklikleri başlar. Bu reseptör özellikle aktif olarak çoğalan endotel ve hematopoetik öncü hücrelerin membranlarında bulunur.[40] VEGFR-3 ise genellikle erişkin lenfatik damar endotelinde yer alır ve lenfanjiogenezin uyarılmasından sorumlu olan VEGF-C ve VEGF-D molekülleri bu reseptöre bağlanır.

VEGF-B endotelyal hücreler için mitojenik olup, VEGF-A ile heterodimer oluşturarak onun anjiogenik etkisini artırır. VEGFR-2 ve 3 reseptörleri aracılığı ile etkisini gösteren VEGF-C ve VEGF-D molekülleri ise embriyonal ve postnatal dönemde lenfanjiogenezde rol oynamaktadırlar. Parapoks virus ailesinden olan Orf virusu tarafından sentezlenen VEGF-E ise VEGFR-2 reseptörüne bağlanarak angiogenezi uyarır.[27]



Şekil 2.2. VEGF izoform-reseptör ilişkisi ve etki mekanizmaları.

Hicklin ve ark.[39'] dan adapte edilmiştir.

VEGF-A,-B,-C,-D,-E, Vaskülar endotelyal büyüme faktörleri, VEGFR: Vaskülar endotelyal büyüme faktörünün reseptörleri, PLGF: Plasenta büyüme faktörü.

VEGF ekspresyonu lokal doku oksijen konsantrasyonu tarafından kontrol edilir. Hipoksik koşullarda hücre çekirdeğindeki VEGF promotor bölgesine HIF-1 (hipoksi ile indüklenen faktör-1) bağlanır. Bu bağlanma sonucu VEGF gen transkripsiyonu ve mRNA stabilitesi artar. VEGF sentezinde artış saptanır.[41] Ayrıca çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler de tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonunu artırarak dolaylı yoldan anjiogenezi uyarırlar.[27] İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü VEGF ekspresyonunu artırarak anjiogenezi uyarmaktadır. HGF ve PDGF de benzer mekanizma ile anjiogenezi uyarabilmektedirler.

VEGF anjiogenezin farklı basamaklarında etkili olan çok fonksiyonlu bir faktördür. Endotelyal hücrelerin geçirgenliğini artırır. Ayrıca VEGF etkisi ile endotelyal hücreler arasındaki bağlantılar gevşer ve hücre membranındaki deliklerin sayısı artar, bu da hücre geçirgenliğindeki artışa katkıda bulunur.[39] Ayrıca VEGF endotel hücrelerden, plazminojen aktive edici moleküllerin,

plazminojen aktivatör inhibitör moleküllerin ve kollejenaz enziminin salınımını uyararak, dengeli bir proteolitik aktivite ile ekstraselüler matriksin anjiogeneze uygun bir şekilde yeniden düzenlenmesini sağlar.[27]

2.4.1.1.VEGF ve İnflamatuvar Barsak Hastalığı

İBH'nın seyrinde barsak epitelinin ülserasyon ve rejenerasyonu olduğu için anjiogenez şüphesiz İBH patofizyolojisinin önemli bir parçasıdır. İBH'daki anjiogenez belirteçleri içerisinde en fazla tanımlananı VEGF'dir. Bir çok çalışma sağlıklı kontrolle karşılaştırıldığında İBH hastalarında dolaşımdaki VEGF düzeyini yüksek bulmuştur.[42,43,44] Griga ve ark, aktif ÜK ve Crohn hastalarında sağlıklı kontrollerle ve remisyonda hastalarla karşılaştırdığında anlamlı derecede yüksek serum VEGF düzeyi bulmuşlardır.[42] Çalışmaların çoğunda serum VEGF düzeyi hastalık aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur.[42-44] Aktif ÜK ve Crohn hastalarında periferal kan mononükleer hücrelerinde VEGF üretimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.[45] Aktif ÜK veya Crohn hastalarının inflamasyonlu mukozaları sağlıklı kontrollerin normal mukozaları ile karşılaştırıldığında VEGF'nin fazla üretimi saptanmıştır.[46] İnflame olmayan mukoza ile karşılaştırıldığında ÜK ve Crohn hastalarının inflame kolon mukozalarının lamina proprialarının immünhistokimya ile VEGF ile boyanması anlamlı olarak yüksektir.[47]

2.4.2. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri (aFGF, bFGF), 18 ve 25-kDa molekül ağırlığında olan ve normal anjiogenezde önemli rol oynayan polipeptidlerdir. FGF tıpkı VEGF gibi endotel hücreleri için mitojenik etkisi olan güçlü bir anjiogenik faktördür.[48,49] Tümör hücrelerinden salgılanan ve parakrin yolla endotel hücre proliferasyonunu uyaran bFGF yanında endotel hücrelerden de bFGF salgılanır ve otokrin etki ile endotel hücre proliferasyonuna neden olur.[50] bFGF angiogenez uyarımında VEGF ile sinerjistik etki gösterir.[51] FGF'nin büyük kısmı sitoplazmik ya da hücre dışı matrikse bağlı olarak bulunur ve ancak hücre hasarı durumunda serbest hale

geçerek serumda tespit edilebilir. Bu da FGF'ün lokal onarıcı anjiogenezde rolü olduğunu göstermektedir.

Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında aktif İBH'da serum bFGF düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.[52] Aktif İBH hastaları remisyonda İBH hastaları ile karşılaştırıldığında bFGF içeren hücrelerin sayısı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.[43]

2.4.3. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF'nin VEGF ve bFGF'ye göre endotel hücreleri üzerindeki mitojenik etkisi daha az olmakla birlikte, endotel hücreleri üzerinde kemotaktik migrasyonu uyarıcı etkisi vardır. PDGF yeni oluşan kapiller damarların perisitler tarafından sarılmasını ve perisitlerin proliferasyonunu sağlar. Böylece kapiller damar duvar bütünlüğünün sağlanmasına katkıda bulunur.[27]

PDGF çoğunlukla makrofaj ve fibroblastlardan inflame kolon mukozasından salgılanır.[53] PDGF'nin İBH'da neovaskülarizasyon, akut inflamasyon ve tamir olaylarında rol aldığı gösterilmiş.[54]

2.4.4. Diğer Faktörler

Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında serum HGF düzeyinin İBH'da yüksek çıktığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada serum HGF düzeyi hastalık aktivitesi ile ilişkili olarak bulunmuştur.[55] HGF ve c-met ekspresyonu inflame ÜK mukozasında artmış ve c-met ekspresyonu ÜK ilişkili kanserlerde artmış olarak bulunmuştur. Bu gözlem HGF-Met sisteminin ÜK'deki inflame mukozanın tamir olayı ile ilişkili olduğunu öngörmektedir.[56]

Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında serum anjiogenin düzeyinin ÜK ve CH'de anlamlı olarak yüksek olduğu fakat hastalık aktivitesi ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.[57] Erken dönemdeki İBH, geç dönemdeki İBH ile karşılaştırıldığında serum anjiogenin seviyesinin anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Bu bilgi İBH'da anjiogeninin inflamasyonu etkileyen bir mediyatör gibi davrandığını fakat hasarlanan mukozanın rekonstrüksyonunda daha önemli bir görevinin olabileceğini öngörmektedir.

Serum Ang-2 ve reseptörü Tie-2 seviyeleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığıda ÜK ve Crohn hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.[58]

MMP-1, MMP-9 ve TIMP-1 (Matriks metalloproteinaz 1 doku inhibitörü) gibi metalloproteinazlar İBH hastalarının ülser tabanlarındaki venlerin vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edilmiştir.[59] MMP-1 veya MMP-1 pozitif venüllerde VEGFR-2 ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Bu durum MMPs'ların İBH'daki anjiogenezde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

Endotel hücre kavşağında eksprese olan transmembran glikoproteini CD146'nın İBH'da artmış olabileceği fikri öngörülmüştür.[60] İBH'dan alınan biyopsi örneklerinde CD146 ekspresyonunun artışının artmış damar yoğunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.5. Anjiogenezi Önleyen Faktörler

Anjiojenezin vücutta endojen inhibitörleri vardır. Bu potent inhibitör ajanlardan trombospondin, angiostatin, endostatin ve interferonlar gibi birçoğu tedavide kullanılmaktadır.

2.5.1. Endostatin

Kollajen tip XVIII'in karboksi terminalinden elde edilen 20-kDa molekül ağırlığında bir bileşeni olan endostatin, ilk olarak O'Reilly ve ark. tarafından fare hemanjioendotelyoma hücrelerinden izole edilmiştir. Endotel hücrelerinin çoğalmasını ve migrasyonunu önler.[61] Kollajen tip XVIII bazal membranlarda, hücre dışı matrikste ve özellikle karaciğerde yoğun olarak bulunur. İn vitro ortamlarda elastaz ve L-katepsin gibi proteinazlar aracılığı ile kollajen tip XVIII'den elde edilen endostatinin, in vivo ortamlardaki elde ediliş mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.[62] İnvaziv tümörlerden salgılanan kollajenazlar, hücre dışı matriks ve bazal membranlardaki kollajen XVIII'den endostatin elde edilmesini sağlar. Ayrıca VEGF de endostatin sentezinde dolaylı olarak rol oynamaktadır.[63,64] Endotel hücrelerinin proliferasyonunu önleyici direkt etkisi yanında endostatin, VEGF mRNA

ekspresyonunu, VEGF sentez ve sekresyonunu azaltarak ya da VEGF KDR/Flk-1 reseptörleri ile etkileşip VEGF sinyal iletimini bozarak da anjiogenezi önlemektedir.[65,66]

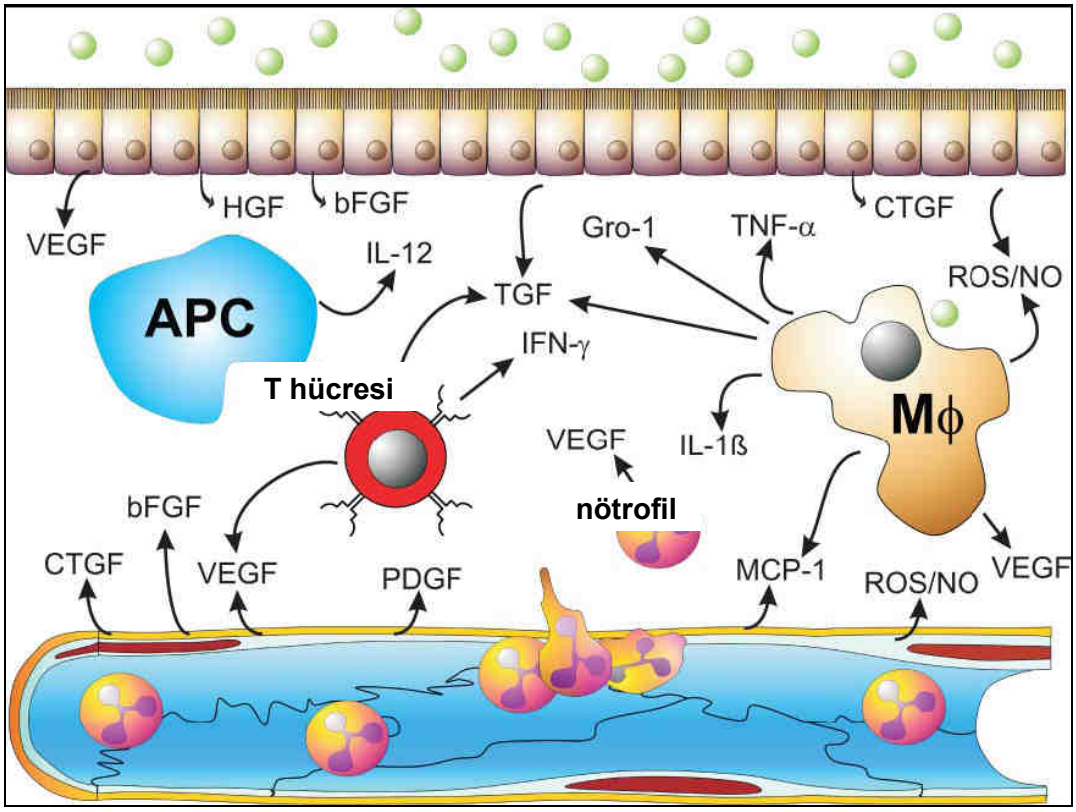
2.5.1.1 Endostatin ve İnflamatuvar Barsak Hastalığı

Endostatin kollajen tip XVIII'in karboksi terminalinden elde edilen 20-kDa molekül ağırlığında bir bileşenidir. Yapılan çalışmalarda endostatin uygulamasının granülasyon doku oluşumunu ve yara vaskülaritesini belirgin bir şekilde azaltarak yara iyileşmesini geciktirdiği gösterilmiştir. Venöz bacak ülser sıvılarında anjiostatin ve endostatin seviyelerinin arttığı gösterilmiştir.[67] Szabo ve ark. ülserlerle giden durumlarda anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin eş zamanlı artışını deneysel modellerde göstermişlerdir.[68,69] ÜK hastalarında serum ve doku endostatin düzeylerini, klinik faktörlerle ilişkisini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2.6. Ülseratif Kolit ve Anjiogenez

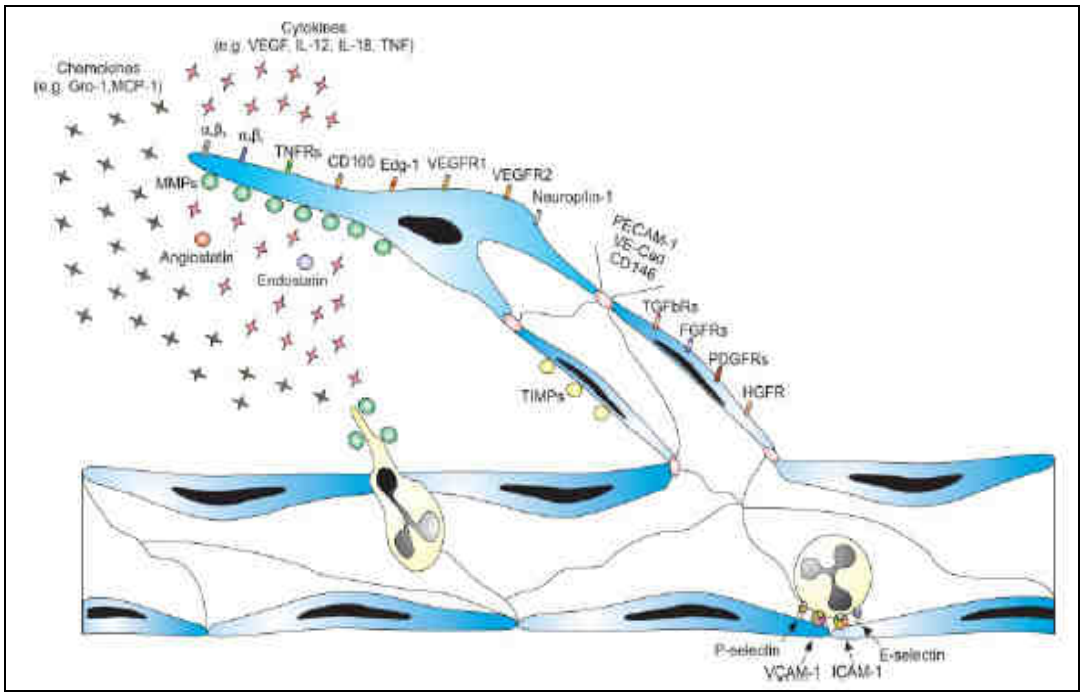
1970 yılında Brahme ve Lindstrom aktif Crohn hastalarında radyolojik hesaplamalarla vaskülaritenin arttığını göstermişlerdir. Son zamanlarda kolitli hastalarda ve deneysel kolit modellerinde yapılan çalışmalar İBH'da mikrovasküler yapının önemine daha fazla dikkat çekmektedir.[70-72] Anjiogenez inflamasyonlu dokudan anjiogenik sitokinlerin salınımı ile başlar. Bunlar endotelyal hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Vazodilatasyona, vasküler permeabilitenin artışına, bazal membranın parçalanmasına neden olurlar. Anjiogenik kemokin ve sitokinler daha sonra endotelyal hücre proliferasyonuna ve göçüne neden olurlar. Çeşitli integrinler, matriks metalloproteinazları ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesine katkıda bulunurlar. Endotelyal hücreler ekstraselüler matrikse göç ederler ve yeni damar oluşumuna yönelirler. Bu evrede oluşmakta olan vasküler yapılar birbirleri ile birleşerek arteriolar-venüler farklılaşmaya yönelirler. Bu olay tamamlandıktan sonra endotel hücre proliferasyonu ve hücre göçü durur, düz kas hücreleri ve perisitler yeni damar yapısını stabilize ederler.[73-75]

İmmün yanıttaki bozukluk İBH ve deneysel kolit modellerinde patogenezdeki temel sorundur. İnflamasyon sırasında endotel hücre yüzeylerindeki adezyon moleküllerin ekspresyonu artarak ortama lökosit çağrılmasına neden olur. Endotel ve lökosit arasındaki etkileşim lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanmasına daha sonra da sıkı adezyon oluşumuna neden olur. Hücresel (lökositler, trombositler) ve biyokimyasal (sitokin/kemokin) kronik inflamasyon mediyatörleri çeşitli mekanizmalarla anjiogenezi stimüle ederler.[76-78] Nötrofiller, monositler ve makrofajlar büyük miktarda VEGF-A ve VEGF-A'nın üretimine katkıda bulunarak NO (nitrik oksit) üretimine katkıda bulunurlar.[79-81] TNF-α (Tümör nekrozis faktör alfa), IL-1β, MCP-1 (Monosit kemoatraktan protein1), Gro-1 (Büyüme düzenleyici onkogene-1) gibi çeşitli proinflamatuvar kemokinler ve sitokinler lökositlerden salınarak neovaskülarizasyona neden olurlar (Şekil 2.3). Bunun yanı sıra lökositler çok miktarda MMPs üreterek anjiogenik yanıtı hızlandırırlar (Şekil 2.4).[82-84] Aktive olmuş T hücrelerinden salınan IFN-γ antijen sunan T hücreleri ve makrofajlarla etkileşime girerek TNF-α, IL-1β, MCP-1, Gro-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 gibi çok sayıda sitokin ve reaktif oksijen ve nitrojen metabolitleri üretirler.[85-87] Bu değişikliklere dayalı olarak kolondaki patolojik anjogenezi inflamasyonun başlattığı düşünülebilinir. Büyüme faktörlerinin yanı sıra hücresel adezyon molekülleri (CAM) ve ligandları, selektinler ve kaderinlerin de kolit ilişkili anjiogenezde rolleri vardır. İnterselüler adezyon molekül-1 (ICAM-1, CD54), β_2-integrinler, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), $\alpha_4\beta_1$-integrinler, trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1,CD31), $\alpha_V\beta_3$-integrin, mukozal hücre adezyon molekülü-1 (MadCAM-1), $\alpha_4\beta_7$, CD146, P-selektin, E-selektin, vasküler endotelyal kaderin (VE-cad) anjiogenik faktörleri üreten hücrelerin ortama çağrılmasında rol oynar (Şekil 2.4). Bu moleküller vasküler endotel üzerinde eksprese olurlar ve anjiogenez veya inflamasyona yanıt olarak miktarları artar.



Şekil 2.3. İnflamatuvar hücrelerden anjiogenik mediyatörlerin salınımı.
Chidlow ve ark.'dan adapte edilmiştir.[87]

İBH'da ortamda bulunan ya da ortama gelen inflamatuvar hücrelerden çok sayıda anjiogenez ve inflamasyon mediyatörleri salgılanır. Nötrofiller, monositler/makrofajlar, T hücreleri, antijen sunan hücreler (APC), anjiogenez stimülatörlerinden sitokinleri, büyüme faktörlerini, kemokinleri salgılarlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.4. İBH ilişkili anjiogenezde adezyon molekülleri, reseptörler, kemokinler, sitokinler ve diğer anjiogenik mediyatörler.
Chidlow ve ark.'dan adapte edilmiştir. [87]

Şekil 2.4 kolitin anjiogenik yanıtı sırasında adezyon moleküllerinin, büyüme faktörlerinin, sitokin reseptörlerinin, sitokinlerin, kemokinlerin, matriks metalloproteinazlarının (MMPs), metalloproteinazların doku inhibitörlerinin (TIMPs), anjiostatin ve endostatinin lokalizasyonunu göstermektedir. Endotel hücreleri mediyatörlerin tariflediği şekilde damar tomurcuğu oluştururlar. Kemokinler, sitokinler ekstraselüler matrikte bulunmaktadır (ECM). MMPs göç eden endoteli içine alacak şekilde ECM'yi yeniden şekillendirirler. TIMPs, MMPs'yi inhibe ederek matriksi stabilize ederler. Reseptörler ligandları ile birleşirler ve endotel büyümesi, proliferasyonu, migrasyonunda sonuçta vasküler maturasyonda rol alırlar. Lökositler endotel hücreleri ve adezyon molekülleri ile etkileşime girerler ve damar duvarına yapışarak inflamasyonlu dokuya anjiogenik mediyatörleri salgılamak üzere göç ederler.

2.7. Anjiogenez ve Yara İyileşmesi

Hasarlanan dokunun revaskülarizasyonu yara iyileşmesinin gerekli bir parçasıdır. Anjiogenez çeşitli büyüme faktörleri ve modülatörleri tarafından düzenlenir. Bunlardan en önemlisi VEGF'dir. Bu protein dokular tarafından iskemik ve inflamatuvar stimulusa yanıt olarak salgılanır ve endotel göçü, proliferasyonu, artmış vasküler permeabiliteye neden olur. Yara iyileşmesi sırasında VEGF ekspresyonu büyük önem taşır çünkü anormal yara iyileşmesi sırasında anjiogenez hasar görmüştür. Mikrovasküler hasar sonrasında pıhtılaşma kaskadı aktive olur. İnflamatuvar hücreler bölgeye gelir, vazoaktif bileşikler salar, plazma ve proteinlerin yara içerisine kaçışına izin verir, bu durum diğer efektör hücrelerin gelmesini sağlar. Trombositler ve monositler aktive olduklarında VEGF salgılarlar. Trombositler aynı zamanda PDGF, TGF-β (Transforme edici büyüme faktörü beta) (anjiogenezi ilerletir, makrofajları çağırır) de salgılarlar. Daha sonra TNF-β ve bFGF salgılanır. Bütün bu faktörler yara iyileşmesi sırasındaki anjiogeneze katkıda bulunur.[88,89]

Endostatinin Flk-1/KDR tirozin reseptörünü bloke ettiği ve bu yolla VEGF aracılı sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir.[90] Bu endostatinin antianjiojenik etkilerinden sorumlu olabilir, yara iyileşmesi gibi VEGF sinyal yolağının aktif olduğu durumlarda bu etki daha fazla olabilir.

Yapılan çalışmalarda endostatin tedavisinin yara iyileşmesini ve granülasyon dokusu oluşumunu geciktirdiği gözlenmiştir.[91-93] Bu duruma ek olarak endostatin fazlalığının yara iyileşmesi sırasında endotel hücre morfolojisini etkilediği, kapiller lümeninin daralmasına veya kapanmasına yol açtığı gözlemlenmiştir.[91]

3. HASTALAR VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Belirlenmesi

Çalışmaya Eylül 2007 ile Temmuz 2008 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniğine başvuran, klinik, radyolojik, endoskopik, histopatolojik kriterlere göre ÜK tanısı almış 39 hasta katıldı. Kontrol grubu olarak Roma III kriterlerine[92] göre İBS tanısı almış (Tablo 3.2) 28 kişi ile 15 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi. Her üç grupta serum VEGF, serum endostatin düzeyleri ölçüldü. ÜK klinik aktivitesi Seo aktivite indeksine[12] göre hesaplandı (Tablo 3.1). ÜK hastalarının tamamı, 28 İBS hastasından 24'ü kolonoskopi ile değerlendirildi. ÜK hasta grubu için Rachmilewitz endoskopik aktivite indeksi[13] (EAİ) (Tablo 3.3) hesaplandı. 39 ÜK, 24 İBS hastasından biyopsi alındı. Biyopsi alınan ÜK hastalarından 6'sının bütün biyopsi örnekleri histopatolojik olarak inaktif hastalıkla uyumlu olduğu için immünhistokimya yöntemi ile değerlendirilmedi. Değerlendirilmeye alınan 33 ÜK hastasından 33 aktif mukoza ve 19 inaktif mukoza örneği ile 24 İBS hastasından 24 normal mukoza örneğinde immünhistokimya yöntemi ile VEGF ve endostatin ekspresyonları çalışıldı. Bütün hastalarda nötrofil sayısı, trombosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit seviyeleri, albumin, total protein, eritrosit sedimentasyon hızı, C-reaktif protein (CRP) seviyeleri kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

1- 18 yaşından küçük, 65 yaşından büyük olmak,
2- Koagülasyon ve trombosit anormalliğine yol açan aspirin, oral antikoagülan, nonsteroid antiinflamatuvar ilaç, serum örneklemesinden 8 hafta öncesine kadar oral kontraseptif kullanan hastalar,
3- Anormal karaciğer ve böbrek fonksiyon testlerine sahip hastalar,
4- Malignansisi olan hastalar,
5- İlave morbid hastalığı olan hastalar,
6- Gebelik,

7- Gastrointestinal sistem cerrahi operasyon geçiren hastalar,

8- Onam formunu imzalamayan hastalar.

Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan 132-3784 karar no'lu izin alınmış ve Helsinki Kriterlerine uygun olarak yürütülmüştür. Tüm hastalardan çalışma öncesi imzalanmış aydınlatılmış onam formu alınmıştır.

Tablo 3.1. Ülseratif Kolit için Seo klinik aktivite indeksi (ÜKAİ)

Parametre	**Katsayı**	**Ağırlık**
1.Dışkıda kan		*60=Y1
yok, az	0	
var	1	
2.Defekayon sayısı/gün		*13=Y2
≤4	1	
5-7	2	
≥8	3	
3.Sedimentasyon hızı(mm/saat)		*0,5=Y3
4.Hb(g/dl)		
5.Albumin(g/dl)		*(-4)=Y4
Sabit değer		*(-15)=Y5
		200

KAİ=Y1+Y2+Y3+Y4+Y5+200
KAİ<150 hafif şiddette hastalık, remisyon
150-220=orta şiddette hastalık ve >220 şiddetli hastalık

Tablo 3.2. İBS için Roma III kriterleri

≥6 ayda başlayan, en az 3 ay süren, aşağıdakilerden en az ikisi ile ilişkili tekrarlayıcı abdominal rahatsızlık veya ağrı;

- Defekasyonla ağrı
- Dışkılama sıklığıyla ilişkili
- Dışkının şeklindeki değişiklikle ilişkili

Tablo 3.3. Rachmilewitz endoskopik aktivite indeksi (EAİ)

		Skor
1. Granülasyon	yok	0
	var	2
2. Vasküler görünüm	normal	0
	azalmış	1
	kaybolmuş	2
3. Frajilite	yok	0
	dokunma ile kanama	2
	spontan kanama	4
4. Mukozal hasar	yok	0
	hafif	2
	belirgin	4

≥4: aktif hastalık, <4 remisyonda hastalık

3. 2. Serum VEGF ve Endostatin Düzeylerinin Ölçümü

ÜK hastaları, İBS hastaları ve sağlıklı gönüllülerden uygun şartlarda en az 5 ml venöz kan örnekleri alındı. Kan örnekleri 10.000 rpm/dak ile 10 dakika santrifüj edilerek serumları elde edildi. Serumları ayrılıp çalışma gününe kadar -20 ºC'de saklandı.

Serum VEGF seviyeleri enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tekniği kullanılarak üretici firmanın (Biosource International, California, USA) talimatlarına uyularak ölçüldü. Örnekler iki kez çalışıldı.

Serum endostatin seviyeleri de ELISA tekniği kullanılarak üretici firmanın (R&D Systems, Minneapolis, MN) talimatlarına uyularak ölçüldü. Örnekler iki kez çalışıldı.

3.3. İmmünhistokimyasal Boyama

İmmünhistokimyasal analizde ÜK ve İBS hastalarına ait kolon mukozası biyopsi materyallerinde VEGF ve endostatin ekspresyonları değerlendirilmiştir. İmmünhistokimyasal boyama poly-L lysol kaplı lamlara alınan 4 mikrometrelik parafin kesitlere uygulanmıştır.

1-Deparafinizasyon:

- 4 mikrometrelik parafin kesitler 70ºC'lik etüvde 1,5 saat bekletildi.

Daha sonra;

- İlk xylende 5 dakika,
- İkinci xylende 5 dakika bekletildi,
- Kurutma işlemi yapıldı,
- %100'lük alkolde 5 dakika,
- %90'lık alkolde 5 dakika,
- %80'lik alkolde 5 dakika bekletildi.
- Distile suda 5 dakika yıkama yapıldı.

2- Antijen retrieval:

VEGF için; 1mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), pH8 olan solüsyonda düdüklü tencerede basınçla 1,5 dakika kaynatılan kesitlere boyama aşamaları uygulandı.

Endostatin için; 0,01M sodyum sitrat pH6 olan solüsyonda düdüklü tencerede basınçla 1,5 dakika kaynatılan kesitlere boyama aşamaları uygulandı.

3- İmmünhistokimyasal boyama:

- PBS (Fosfat buffer solüsyonu)'de 5 dakika yıkama,
- %3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübasyon (endojen peroksidaz aktivitesinin ortadan kaldırılması),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Ultra V Blok solüsyon (5 dakika inkübasyon)
- Primer antikor (VEGF, Thermo Fisher Scientefic, Fremont CA, USA, 1/100, endostatin, Hycult Biotechnlogy, Netherlands, 1/15) (1.5 saat inkübasyon)
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Value Primary Antikor Enhacer (20 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,

- Value HRP Polymer (ışığa hassas olduğu için karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Kromojen (3,3'Diaminobenzidine) (5 dakika inkübasyon),
- PBS'de 5 dakika yıkama,
- Mayer's Hematoksilen'de1 dakika bekletme
- Akan su altında 5 dakika yıkama,
- %100'lük alkolde 1 dakika bekletme,
- %90'lık alkolde 1 dakika bekletme,
- %80'lik alkolde 1 dakika bekletme,
- Kesitler kuruduktan sonra xylende 2 dakika bekletme
- Kapama (Aqueous mounting medium).

Kesitlerin kurumaması amacıyla yapılan işlemlerin tüm basamakları oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda (humid chamber) uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak VEGF için kolon mukozası, endostatin için prostat dokusu kullanılmıştır.

VEGF ve endostatin ekspresyonları epitelde, stromada ve damar endotelinde değerlendirilmiştir. Hücrelerde intrasitoplazmik boyanma pozitif olarak değerlendirildi. Boyanma yaygınlığı; - boyanma yok, + birkaç hücrede boyanma var, ++ hücrelerin yarıya yakınında boyanma var, +++ hücrelerin yarıdan çoğunda boyanma var, boyanma şiddeti ise + zayıf sitoplazmik boyanma, ++ belirgin sitoplazmik boyanma, +++ şiddetli sitoplazmik boyanma şeklinde değerlendirildi. Değerlendirmeler aynı patolog tarafından yapıldı.

3.4. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel değerlendirmeler; Statistical Package for Social Sciences for Windows Version 15.0 (SPSS Inc; Chicago IL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi. Dağılımların normalliğine bakıldı. Grup sayısı iki olan verilerde dağılım normal ise t testi, normal değilse Mann

Whiyney-u testi kullanıldı. Grup sayısı ikiden fazla olduğunda dağılım normal ise ANOVA, normal değilse Kruskal Wallis kullanıldı. Yapılan test sonucunda bulunan p değeri anlamlı ise farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak için çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 82 hastaya ait klinik ve demografik özelikler tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. Çalışma hastalarına ait demografik ve klinik özellikler

	ÜK (n=39)	**İBS (n=28)**	**SK (n=15)**
Yaş (ortalama±SD)	46.05±12.60	48.18±11.67	41.40±11.55
Dağılım (minimum-maksimum)	18-65	23-65	24-64
Cinsiyet (kadın/erkek)	15/24	18/10	7/8
Hastalık süresi (ortalama±SD)(ay)	73.92±58.3		
Hastalık tutulum yeri			
Proktit (n)	7		
Sol kolon tutulumu (n)	16		
Pankolit (n)	16		
Klinik aktivite			
Hafif, remisyon (n)	9		
Orta (n)	22		
Şiddetli (n)	8		
Endoskopik aktivite			
Remisyonda (n)	20		
Aktif (n)	19		
İHK ile değerlendirilen kolon mukoza sayısı (n)	52	24	
Aktif mukoza (n)	33		
İnaktif mukoza (n)	19		

İHK: immünhistokimya

Çalışmaya alınan her 3 grup arasında yaş ve cinsiyet bakımından anlamlı fark saptanmadı.

Çalışmaya alınan 39 ÜK hastasının serum örneklemesi sırasında kullandıkları ilaç çeşitleri tablo 4.2'de gösterilmiştir. 32 hasta 5-aminosalisilat preperatı, 7 hasta prednizon/metilpredizon, 1 hasta siklosporin, 5 hasta azotiopürin, 5 hasta da antibiyotik kullanıyordu.

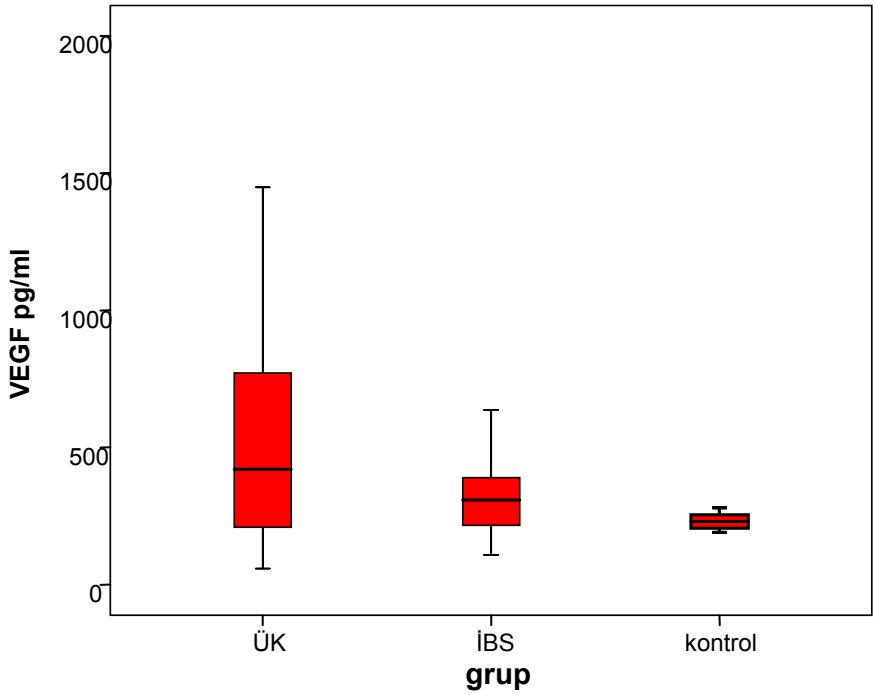
Tablo 4.2. Ülseratif kolit hastalarında serum örneklemesi sırasında kullanılan ilaç çeşitleri

Hastalık	İlaç tipi	Yüzde
Ülseratif Kolit (n=39)	5-aminosalisilat preperatı	82.1
	Prednizon/metilprednizon	20.5
	Azotiopürin	12.8
	Siklosporin	2.6
	Metronidazol/siprofloksasin/ampisilin	12.8
	İlaç yok	7.7

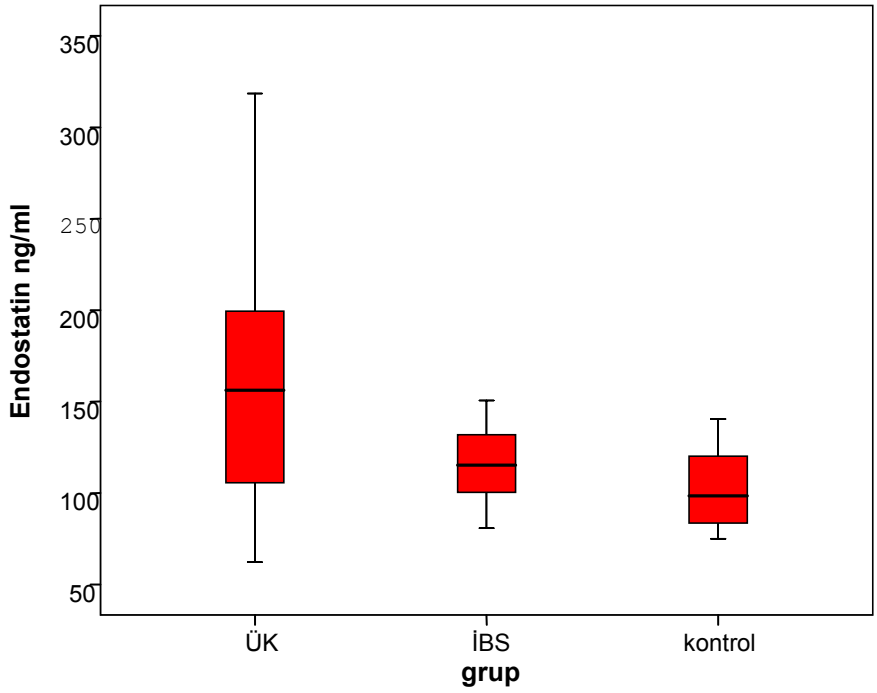
Tablo 4.3. Çalışma hastalarında serum VEGF ve serum endostatin düzeyleri

	ÜK(n=39)	İBS(n=28)	SK (n=15)	p
VEGF (pg/ml)				
ortalama	511.90±377.52	305.03±121.42	236.08±40.6	0.011
ortanca (min-maks)	420.76(59.2 – 1700.2)	309.3(108.6 -638.1)	230.41(190.5-340.4)	
endostatin (ng/ml)				
ortalama	155.50±59.80	116.87±23.80	102.17±2.41	0.001
ortanca (min-maks)	156.12(62,1-318.4)	115.28(80.8-194.1)	98.48(75.0-140.6)	

Serum VEGF ve serum endostatin düzeylerinin ortalama değerleri gruplar arası karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla p=0.011 ve p=0.001) (Tablo 4.3). Çoklu karşılaştırma testinde ortalama serum VEGF düzeyleri ÜK ve İBS grupları, İBS ve sağlıklı kontrol (SK) grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmazken (sırasıyla; p=0.062 ve p=0.167), ÜK ve SK grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0.003) (Şekil 4.1). Ortalama serum endostatin düzeyleri için çoklu karşılaştırma testi yapıldığında ÜK ve İBS grupları ile ÜK ve SK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken (sırasıyla; p=0.003, p<0.001), İBS ve SK grupları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.128) (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Çalışma hastalarında ortanca serum VEGF düzeyleri



Şekil 4.2 Çalışma hastalarında ortanca serum endostatin düzeyleri

Seo klinik aktivite skoruna göre; ÜK hastalarının 9'u hafif-remisyonda hastalık grubuna, 22'si orta şiddette hastalık grubuna, 8'i şiddetli hastalık grubuna dahil olmuştur. Ortalama serum VEGF ve serum endostatin düzeyleri ÜK hastalarının klinik aktivitelerine göre karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla p=0.018 ve p=0.008) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. ÜK hastalarında klinik aktivite şiddetine göre serum VEGF ve endostatin düzeylerinin karşılaştırılması

	Ülseratif Kolit			**p**
	Hafif-Remisyon	**Orta**	**Şiddetli**	
VEGF (pg/mL)				
ortalama	290.26±209.90	477.16±283.66	856.81±528.24	0.018
ortanca (min-maks)	229.9(63.8-755.5)	425.1(59.2-1037.3)	837.4(75.4-1700.2)	
endostatin (ng/ml)				
ortalama	107.16±33.52	164.46±59.97	185.86±55.40	0.008
ortanca (min-maks)	97.0(74.9-182.2)	156.6(62.1-318.4)	199.3(75.7-271.0)	

Ortalama serum VEGF değeri için hafif-remisyon ile orta şiddetteki hastalık grupları ve orta şiddetteki ve şiddetli hastalık grupları karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla; p=0.077 ve p=0.064). Hafif-remisyon grubu ile şiddetli hastalık grupları karşılaştırıldığında fark anlamlı bulunmuştur (p=0.004). Ortalama serum endostatin düzeyleri için çoklu karşılaştırma testi yapıldığında hafif-remisyon grubu ile orta şiddetteki ve şiddetli hastalık grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur (sırasıyla; p=0.005 ve p=0.003). Orta ve şiddetli hastalık grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p=0.354) (Tablo 4.4).

Tablo 4.5. ÜK hastalarında hastalık bölgesine göre serum VEGF ve serum endostatin düzeyleri

	Ülseratif Kolit			p
	Proktit	Sol kolon tipi	Pankolit	
VEGF (pg/ml)				
ortalama	430.02±340.01	529.17±375.12	530.48±412.66	0.795
ortanca (min-maks)	386.2(59.2-1037.3)	423.7(63.8-1447.2)	440.3(75.4-1700.2)	
endostatin (ng/ml)				
ortalama	157.65±54.10	160.72±66.50	149.36±58.27	0.822
ortanca (min-maks)	156.1(107.6-238.1)	177.1(74.9-318.4)	145.1(62.1-271.0)	

Ortalama serum VEGF ve endostatin değerleri ÜK hastalarında hastalık bölgesine göre karşılaştırıldığında aralarında fark saptanmamıştır (p>0.05) (Tablo 4.5).

Endoskopik aktivite indeksine göre ÜK hastaları aktif (n=19) ve remisyonda (n=20) hastalık olarak gruplandırıldığında ortalama serum VEGF değerleri sırasıyla 660.2±416.5 pg/ml ve 371.0±278.9 pg/ml (p=0.011) serum endostatin değerleri sırasıyla 179.8±65.1 ng/ml ve 132.4±44.6 ng/ml (p=0.012) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6. ÜK hastalarında serum VEGF, serum endostatin, ÜKAİ, EAİ, akut faz reaktanları arasında lineer korelasyon katsayıları: (r) korelasyon katsayısı, (p) istatistiksel anlamlılık

	Ülseratif Kolit				
		VEGF		Endostatin	
	Çift sayısı	r	p	r	p
ÜKAİ	39	0.459	0.003	0.475	0.002
EAİ	39	0.388	0.015	0.402	0.011
ESH	39	0.727	<0.001	0.379	0.017
CRP	39	0.416	0.008	0.398	0.012
Trombosit	39	0.542	<0.001	0.291	0.072
Albumin	39	-0.401	0.01	-0.272	0.093
Hematokrit	39	-0,202	0,216	-0,22	0,894
Fibrinojen	39	0,198	0,226	0,127	0,442
VEGF	39			0,422	0,008
endostatin	39	0,422	0,008		

ÜK hastalarında serum VEGF, serum endostatin, ÜKAİ, EAİ, akut faz reaktanları arasında lineer korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında serum VEGF düzeyi ile ÜKAİ, EAİ, ESH, CRP, trombosit, serum endostatin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki (sırasıyla; p =0.008, p=0.015, p<0.001, p=0.008, p<0.001 ve p=0.003) albümin ile istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki (p=0.01) saptanmıştır. Serum endostatin düzeyi ile ÜKAİ, EAİ, ESH, serum VEGF, CRP arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki (sırasıyla p=0.002, p=0.011, p= 0.017, p=0.008, p=0.012) saptanmıştır (Tablo 4.6).

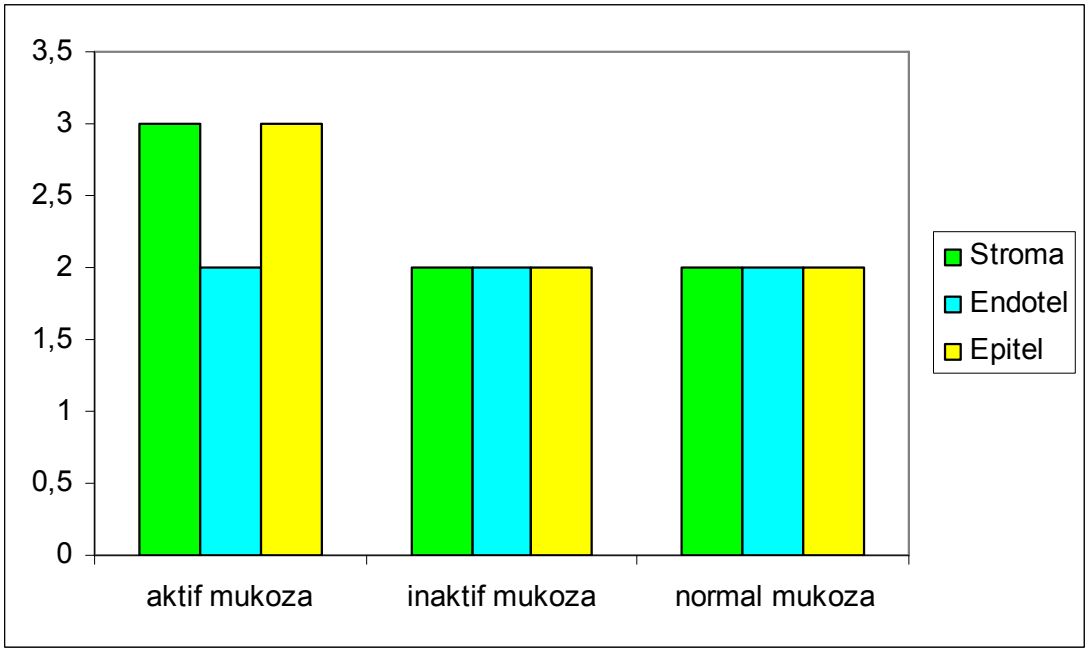
Tablo 4.7. ÜK hastalarına ait aktif mukoza, inaktif mukoza ile İBS hastasına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ekspresyon değerleri

VEGF	Ülseratif Kolit (n=52)						İBS (n=24)		
	Aktif Mukoza (n=33)			İnaktif Mukoza (n=19)					
	stroma	endotel	epitel	stroma	endotel	epitel	stroma	endotel	epitel
Şiddet									
ortalama	2.7±0.4	2.4±0.5	2.7±0.4	2.3±0.4	2.0±0.6	2.3±0.4	1.8±0.4	1.8±0.5	2.1±0.6
ortanca(min-maks)	3(2-3)	2(2-3)	3(2-3)	2(2-3)	2(1-3)	2(1-3)	2(1-2)	2(1-3)	2(1-3)
Yaygınlık									
ortalama	2.7±0.5	2.5±0.5	2.8±0.3	2.1±0.5	2.2±0.8	2.3±0.5	1.9±0.3	1.7±0.6	2.3±0.4
ortanca(min-maks)	3(1-3)	3(2-3)	3(2-3)	2(1-3)	2(1-3)	3(2-3)	2(1-2)	2(1-3)	2(2-3)

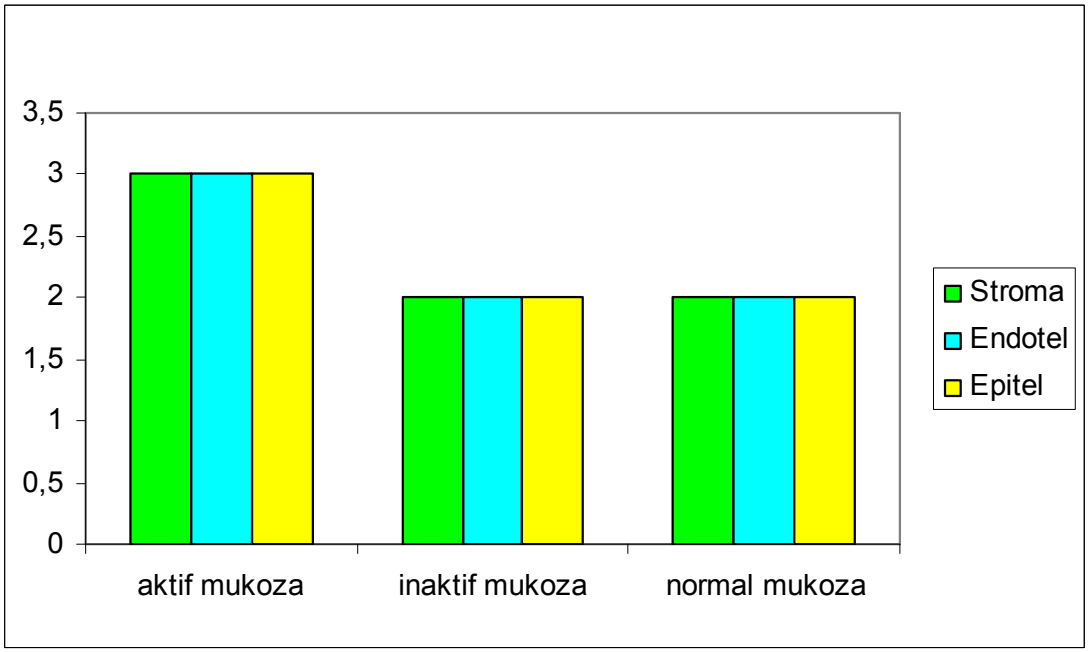
ÜK hastalarında aktif ve inaktif mukoza grupları VEGF ekspresyonu şiddet ve yaygınlık açısından stroma, endotel ve epitelde karşılaştırıldığında bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (boyanma şiddeti için sırasıyla p=0.04, p=0.008, p=0.001 boyanma yaygınlığı için sırasıyla p=0.001, p=0.026, p=0.007). Aktif mukoza ve inaktif mukoza gruplarında stroma, endotel ve epitelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı arasında korelasyon bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (sırasıyla aktif grup için; r=0.767, p<0.001, r=0.465, p=0.006, r=0.544, p=0.001 sırasıyla inaktif grup için; r=0.662, p=0.02, r=0.755, p<0.01, r=0.877, p<0.001). Aktif grup ve İBS grubu, inaktif grup ve İBS grubunda ayrı ayrı VEGF ekspresyonu şiddet ve yaygınlık açısından stroma, endotel ve epitelde karşılaştırıldı. Aktif grup ile İBS grubu arasında her üç bölgede de

şiddet ve yaygınlık açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (boyanma şiddeti için sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$ boyanma yaygınlığı için sırasıyla $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$). İnaktif grup ile İBS grubu karşılaştırıldığında stromada boyanma şiddeti ($p=0.002$) ve endotelde boyanma yaygınlığı ($p=0.035$) dışında fark saptanmadı. İBS grubunda stroma, endotel ve epitelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı arasında korelasyon bakıldığında epitel dışında korelasyon saptanmadı ($r=0.844$, $p<0.001$) (Tablo 4.7).

ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ile boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı şekil 4.3 ve şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ile boyanma şiddeti



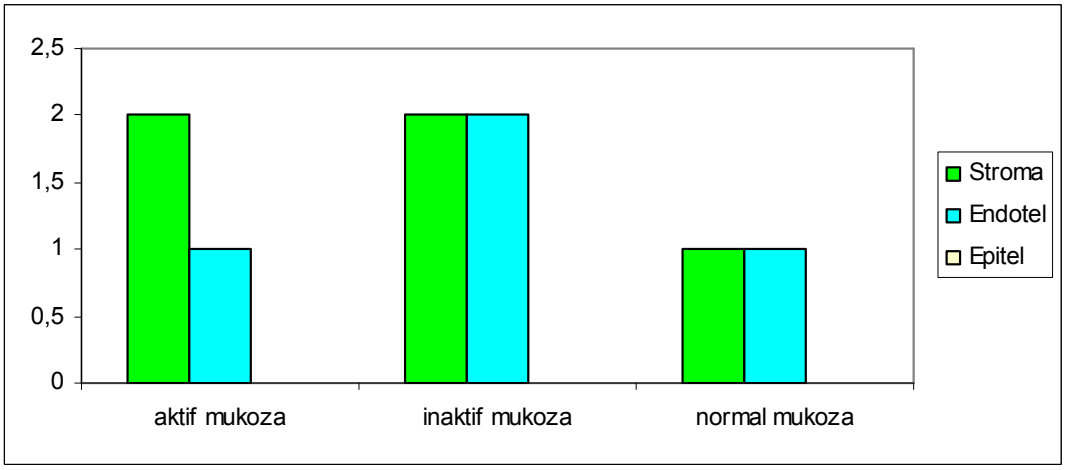
Şekil 4.4. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde VEGF ile boyanma yaygınlığı

Hiçbir grupta epitelde endostatin ekspresyonu gözlenmedi. Aktif mukoza ve inaktif mukoza gruplarında stroma ve endotelde endostatin ekspresyonu şiddet ve yaygınlık açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p>0.05$). Aktif ve inaktif mukoza gruplarında stromada ve endotelde endostatin ekspresyonu açısından şiddet ve yaygınlık arasında pozitif korelasyon saptandı (aktif grup için sırasıyla; $r=0.603$, $p<0.001$, $r=0.888$, $p<0.001$, inaktif grup için; $r=0.460$, $p=0.47$, $r=0.714$, $p=0.001$). Aktif ve İBS grup karşılaştırıldığında boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından stroma ve endotelde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (boyanma şiddeti için sırasıyla $p=0.005$ ve $p=0.026$, boyanma yaygınlığı için sırasıyla; $p<0.001$, $p=0.013$). İnaktif grupla İBS grubu stroma ve endotelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından karşılaştırıldığında sadece stromal boyanma şiddetinde fark saptanmamıştır ($p=0.277$), stromal boyanma yaygınlığı ($p=0.044$), endotel boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla; $p=0.002$ ve $p=0.012$) (Tablo 4.8).

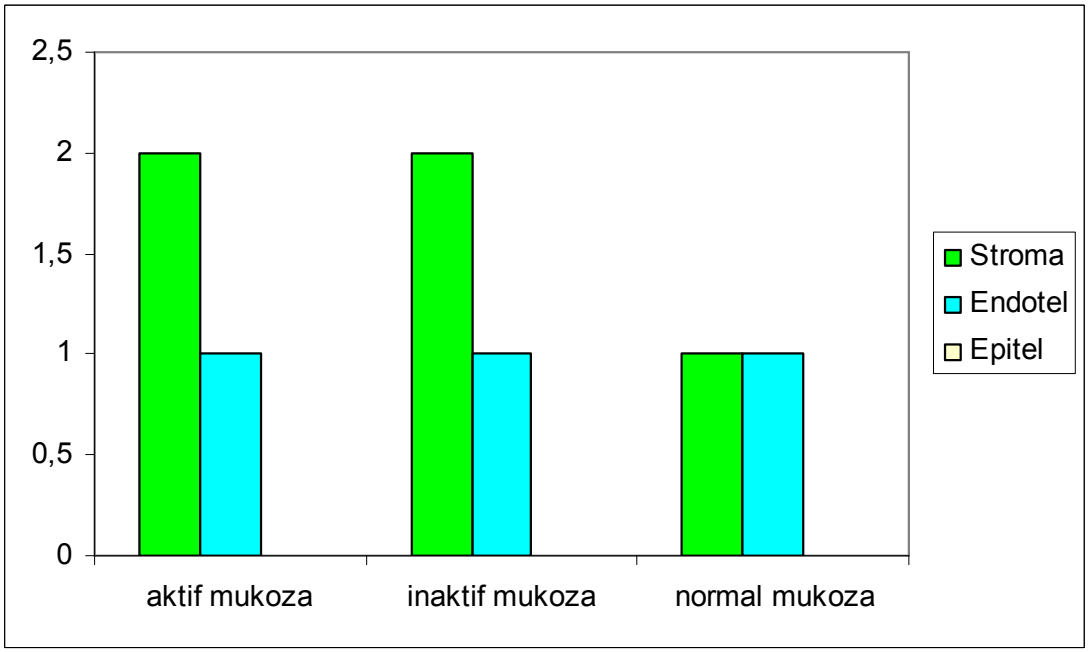
Tablo 4.8. ÜK hastasına ait aktif mukoza, inaktif mukoza ile İBS hastasına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ekspresyon değerleri

Endostatin	Ülseratif Kolit						İBS		
	Aktif Mukoza			İnaktif Mukoza					
	stroma	endotel	epitel	stroma	endotel	epitel	stroma	endotel	epitel
Şiddet									
ortalama	2.0±0.7	1.3±0.8	0	1.7±0.7	1.7±0.9	0	1.5±0.5	0.8±0.8	0
Ortanca(min-maks)	2(1-3)	1(0-3)		2(1-3)	2(0-3)		1(1-2)	1(0-2)	
Yaygınlık									
ortalama	2.2±0.7	1.4±0.9	0	1.9±0.8	1.4±0.8	0	1.5±0.5	0.7±0.7	0
Ortanca(min-maks)	2(1-3)	1(0-3)		2(1-3)	1(0-3)		1(1-2)	1(0-2)	

ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ile boyanma şiddeti ve yaygınlığı şekil 4.5 ve şekil 4.6'da gösterilmiştir.



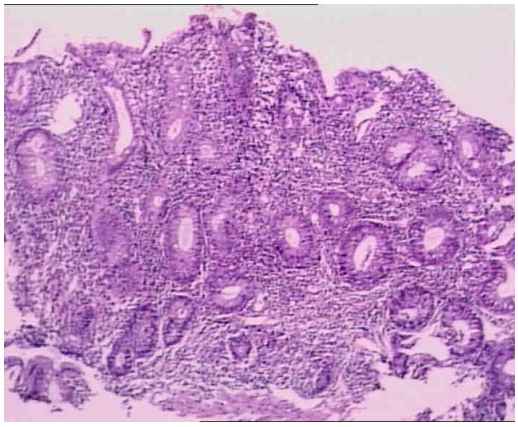
Şekil 4.5. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ile boyanma şiddeti



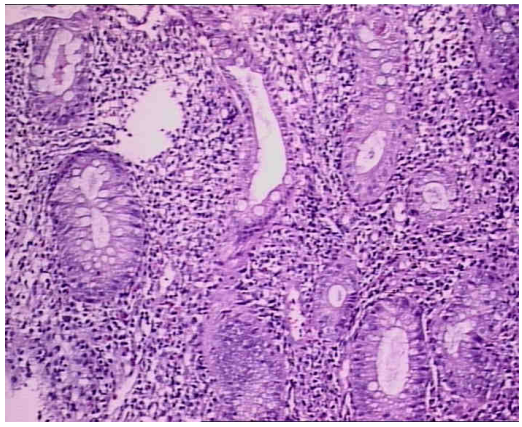
Şekil 4.6. ÜK hastalarına ait aktif, inaktif ve İBS hastalarına ait normal mukoza örneklerinde endostatin ile boyanma yaygınlığı

Aktif grup ile inaktif grup, aktif grup ile İBS grubu, inaktif grup ile İBS gruplarında stroma ve endotelde boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı açısından VEGF ve endostatin ekspresyonları arasında korelasyon bakıldığında sadece aktif grubunun stroma alt grubunda VEGF ve endostatin ekspresyonları arasında boyanma şiddeti yönünden pozitif korelasyon saptandı ($r=0.406$, $p=0.019$).

Ortalama serum endostatin ve serum VEGF düzeyleri ÜK hastalarında kullandıkları ilaçlara göre değerlendirildiğinde 5-aminosalisilat kullanan hastalarda ortalama serum endostatin düzeyleri kullanmayanlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p=0.012$). Diğer ilaçlar ile ortalama serum endostatin ve serum VEGF düzeyleri arasında ilişki saptanmadı ($p>0.05$).



Şekil 4.7.a



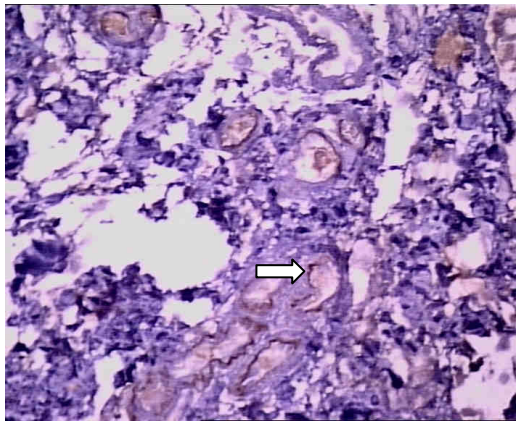
Şekil 4.7.b



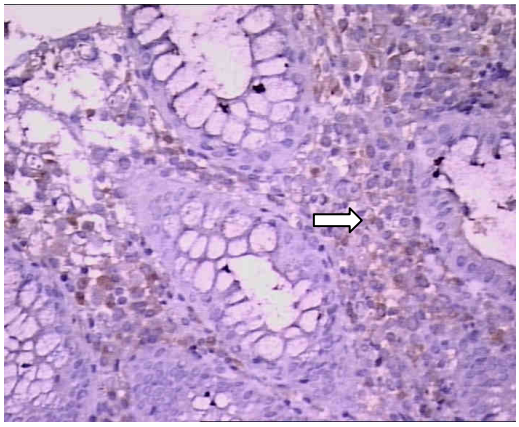
Şekil 4.7. c

Şekil 4.7. ÜK hastalarının aktif ve inaktif kolon mukozalarının hematoksilen eozin boyası ile gösterilmesi

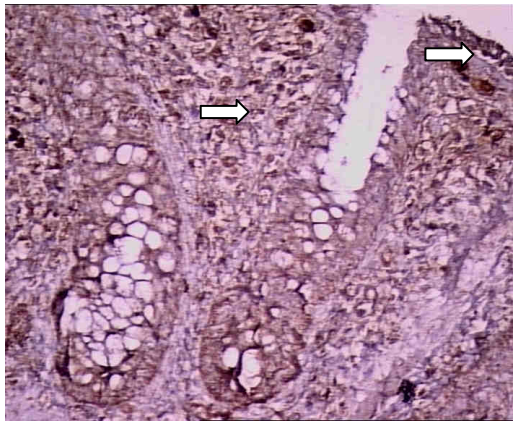
a. aktif kolon mukozası, x100
b. aktif kolon mukozası, x200
c. inaktif kolon mukozası, x200



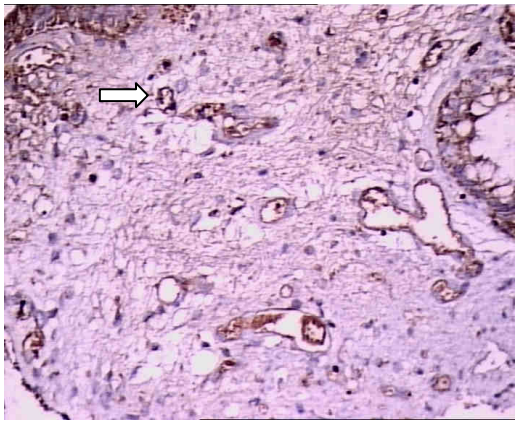
Şekil 4.8.a



Şekil 4.8.b



Şekil 4.8.c



Şekil 4.8. d

Şekil 4.8. ÜK hastalarının kolon mukozalarında immünhistokimya yöntemi ile VEGF ve endostatin ekspresyonları

a. endotelde endostatin ekspresyonu, x400
b. stromada endostatin ekspresyonu, x400
c. stroma ve epitelde VEGF ekspresyonu, x400
d. endotelde VEGF ekspresyonu, x400

5. TARTIŞMA

ÜK ve Crohn hastalığını içeren İBH; etkilenen kişilerde çevresel faktörler, genetik faktörler ve immün sistemin ilişkisinden kaynaklanan kolon mukozasının kronik inflamatuvar bozukluğudur.[3] İBH patolojisi daima lökosit infiltrasyonu, intestinal mukoza hasarı, ülserasyon ve rejenerasyonu içeren inflamatuvar döngüyü içerir. Hastaların barsak mukozaları sürekli bir epitelyal rejenerasyon içerisindedir. Bu yüzden anjiogenez aktivasyonu gerekli bir moleküler olaydır. İBH'nın barsak dokularındaki anjiogenik oluşum çeşitli vasküler ve inflamatuvar hücre tiplerini (endotel hücreleri, perisitler, trombositler, lökositler) ve mediyatörleri içerir. Epitel hasarını takiben yeni kapiller oluşumunu sağlamak için uygun barsak mikroçevresini sağlamak üzere çeşitli moleküller ve hücreler birbiri ile ilişki halindedir. Yeni damar oluşumu proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasındaki değişen denge tarafından düzenlenir. Hipoksi ve anoksi gibi bir stimulusa yanıt olarak proanjiogenik ve antianjiogenik moleküllerin ekspresyonu vasküler homeostazisi yeniden düzenlemek için değişebilir. İBH'da anormal olarak eksprese olan sitokinlerin otokrin ve parakrin etkileri fizyolojik olan anjiogenezi kronik barsak inflamasyonunun devamını sağlayacak şekilde patolojik hale dönüştürebilir. Patolojik anjiogenezde proanjiogenik ve antianjiogenik moleküller dengeyi sağlayamaz.[93]

Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalarda aktif İBH'da artmış anjiogenezden bahsedilmektedir.[94,95] Bu çalışmalar; anjiogenez stimülasyonunun doku inflamasyonunun başlatılmasında ve devamlılığında önemli patofizyolojik rolü olduğunu öne sürmektedir. Anjiogenez patolojik sürece katkısının yanı sıra ÜK'de gözlenen ülser iyileşmesi için de gerekli bir durumdur. İBH'da VEGF, b-FGF, TGF-β, HGF, PDGF gibi anjiogenik sitokinlerinin üretiminin arttığı bildirilmiştir.[43,45,96-100] Bunlar içerisinde en etkili anjiogenik büyüme faktörü VEGF'dir. Anjiogenik faktörlerdeki artışa rağmen ÜK ilişkili mukozal hasar iyileşmesinin neden yavaş olduğu bilinmemektedir. Sandor ve ark. deneysel kolit modellerinde mukoza örneklerinde gösterilen

VEGF ekspresyonundaki artışın yanı sıra endostatin ve anjiostatin gibi anjiogenez inhibitörlerinin ekspresyonlarının artışını göstermiş bu durumun anjiogenik faktörlerdeki artışa rağmen ÜK ilişkili mukozal hasardaki gecikmenin nedeni olabileceği üzerinde durmuşlardır.[68]

Endostatinin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Michaels ve ark. farelerde yaptığı çalışmada günde iki kez 20 mg/kg endostatin uygulamasının granülasyon doku oluşumunu, yara vaskülaritesini belirgin bir şekilde azaltarak yara iyileşmesini geciktirdiği, topikal olarak uygulanan VEGF'nin bu etkileri antagonize ettiği gösterilmiştir.[101] Bloch ve ark. çalışmasında günde tek doz 0,3 mg/kg endostatin kullanılmış, damar maturasyonunun bozulmasına rağmen yara iyileşmesinde gecikme olmamıştır.[91] Smith ve ark. alt ekstremitedeki venöz ülser sıvılarında anjiostatin ve endostatin seviyesinin artığını göstermişlerdir.[67] Szabo ve arkadaşları deneysel kolit ve duedenal ülser modellerinde doku düzeyinde anjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin eş zamanlı artışını göstermişlerdir.[67-68]

Biz de çalışmamızda ÜK hastalarında VEGF ve endostatinin serum düzeylerini, hastalık aktivitesi ile ilişkisini, immünhistokimya yöntemi ile VEGF ve endostatinin doku ekspresyonlarını, mukozal hasar ile ilişkisini değerlendirdik. Çalışmamız literatüre göre endostatinin ÜK hastalarında serum ve doku örneklerinde çalışıldığı ilk klinik çalışma olması nedeni ile önem taşımaktadır.

Bizim çalışmamızda da serum VEGF düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diğer çalışmalara benzer olarak yüksek bulunmuştur. ÜK hastaları hastalık şiddetine göre kendi içerisinde ayrıldığında hafif-remisyon grubu ile şiddetli hastalığa sahip grup arasındaki fark yine mevcut çalışmalarda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.004$).[43,96,98] Hafif derecedeki hastalık grubu ile orta şiddeteki hastalık grubu, orta şidetteki hastalık grubu ile şiddetli hastalık grubu arasında ortalama serum VEGF düzeyleri açısından fark olmakla birlikte bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla; $p=0.077$, $p=0.064$). Serum VEGF ve klinik aktivite indeksi, endoskopik aktivite indeksi, akut faz reaktanları arasındaki ilişki

Bousvaros ve ark. çalışmasına benzer olarak bulunmuştur.[96] Bu durum, inflamatuvar ortam ya da doku hipoksisinin ÜK ilişkili dokularda VEGF üretimini arttırması, VEGF'nin vasküler permeabiliteyi arttırması proinflamatuvar hücrelerin ve sitokinlerin ortama akışı, sonuçta inflamatuvar durumun abartılı bir şekilde artması ile açıklanabilir.

Literatürde İBH'da doku VEGF ekspresyonunun arttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Griga ve ark. İBH epitelinde VEGF ekspresyonunun arttığını, İBH'nın inflame mukozasında VEGF üreten lökositlerin interstisyel alanda biriktiğini göstermişlerdir.[46] Kanazawa ve ark. ÜK ve Crohn hastalarında endotel ve epitelde VEGF ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. VEGF boyanması aktif ÜK hastalarında inaktif hastalardan daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmada kontrol grubunda VEGF ekspresyonu gözlenmemiştir.[43] Kapsoritakis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Crohn hastalarında VEGF ekspresyonu gözlenmemiş.[98] Bizim çalışmamızda, VEGF ÜK hastalarının aktif ve inaktif mukoza örnekleri ile İBS hastalarının normal kolon mukozalarında stroma, endotel ve epitelde eksprese olmuştur. Aktif mukoza ve inaktif mukoza arasında, aktif mukoza ve normal mukoza grubu arasında boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından anlamlı fark saptanmıştır. İnaktif mukoza ile normal mukoza grubu karşılaştırıldığında stromadaki boyanma şiddeti ve endoteldeki boyanma yaygınlığı inaktif mukoza grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum Tsiolakidou ve ark.'nın çalışmasına benzerdir.[102] Tsiolakidou'nun çalışmasında VEGF ekspresyonu İBH hastalarında kontrol grubundan fazla bulunmuş, aktif ve inaktif İBH mukozası arasında, inaktif İBH mukozası ile kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır.

Literatürde serum İBH'da serum endostatin düzeyleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat benzer bir şekilde kronik inflamasyonla giden çeşitli kollajen doku hastalıklarında serum düzeyleri çalışılmıştır. Serum endostatin düzeyi sistemik sklerozlu hastalarda normal kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.[103] Romatoid artrit hastalarının periferik kan ve eklem sıvısı örneklerinde endostatin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark saptanmamışır. 4-5 ay ilaç

tedavisinden sonra bakılan serum VEGF düzeyleri anlamlı derecede düşmüş bunun yanı sıra endostatin seviyeleri artmış olarak bulunmuştur. RA'daki anjiogenezin anjiogenik faktör ve anjiogenez inhibitör üretimi arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı sonucuna varılmıştr.[104] Ma ve ark. farelerde ülser indüksiyonunun serum VEGF düzeyini arttırdığını bunun yanı sıra endostatin düzeyini azalttğını göstermişlerdir. Gastrik ülser iyileşmesinin trombositler tarafından büyüme faktörlerinin salınımı ile düzenlenebileceğini öne sürmüşlerdir.[105]

Guenther ve ark. çalışmalarında normal kolon ve kolorektal kanserli hastaların kolon mukozalarında endostatin ekspresyonu çalışılmış, her iki grupta stroma ve endotelde ekspresyon mevcutken epitelde saptanmamıştır.[106]

Bizim çalışmamızda serum endostatin düzeyleri ÜK grubunda İBS grubu ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İBS grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında fark saptanmamıştır. Serum endostatin düzeyi ile klinik aktivite indeksi, endoskopik aktivite indeksi, CRP, ESH, trombosit arasında korelasyon saptanmıştır. Bunların yanı sıra serum VEGF ve endostatin düzeyleri arasında da pozitif korelasyon saptanmıştır. İBS ve sağlıklı kontrol gruplarında VEGF ve endostatin arasında korelasyon saptanmamıştır (p=0.436, p=0.403).

İmmünhistokimyasal değerlendirmede hiçbir grupta epitelde endostatin ekspresyonu Guenther ve ark. çalışmasına benzer bir şekilde gözlenmemiştir. ÜK hastalarının aktif mukozaları ile inaktif mukozaları arasında endostatin ekspresyonu açısından fark saptanmazken, aktif mukoza ile normal mukozaya sahip İBS grubu arasında, inaktif mukoza ile normal mukoza arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

Çalışmamızda serum endostatin düzeyleri ÜK hastalarının kullandıkları ilaçlara göre değerlendirildiğinde 5-aminosalisilat kullanan hastalarda kullanmayanlara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır (p=0.012). Bu durum Nagashima ve ark. RA hastalarında yaptığı çalışma ile benzerdir.[104]

İntestinal inflamasyonun başlangıcında ve sürdürülmesinde anjiogenezin varlığının saptanmasından sonra VEGF, Ang, integrinler, gibi anjiogenezi hedefleyen moleküller İBH'da potansiyel bir tedavi aracı gibi düşünülmektedir. Bunun yanı sıra anjiogenezin yara iyileşmesindeki olumlu fizyolojik etkileri düşünülerek yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. HGF ve bFGF uygulamalarının klinik ve histolojik hastalık skorlarında düzelmeye neden olduğu deneysel kolit modellerinde gösterilmiştir.[107,108] Sinha ve ark. aktif sol kolon koliti veya proktiti olan ÜK hastalarında zayıf endotelyal mitojen ve VEGF ekspresyon indükleyicisi olan EGF (epidermal büyüme faktörü) içeren lavman kullanımı ile oral meselamin kullanımını karşılaştırmışlar. İki hafta sonunda lavman kullanan 12 hastadan 10'u, kontrol grubunda 12 hastadan 1'i remisyonda imiş ($p<0.001$). Hastalık aktivite skoru, endoskopik skor ve histolojik skor EGF grubunda daha iyi olarak değerlendirilmiş ($p<0.01$).[109]

Bu çalışmada VEGF'nin yanı sıra anjiogenez inhibitörü olan endostatinin de ÜK hastalarında serum ve doku düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bu sonuç ÜK hastalarında VEGF artışına rağmen mukozal ülserlerdeki iyileşmenin neden yavaş olduğu ve hastalığın kronikliğinin sebebi hakkında fikir verebilir, anjiogenezi hedefleyen tedavi seçeneklerinin hastalığın hangi aşamasında kullanılabileceği hakkında yol gösterici olabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, ÜK hastalarında serum VEGF ve endostatin düzeylerinin ölçümü, hastalık aktivitesi ve birbirleriyle olan ilişkileri, immünhistokimya yöntemi ile doku VEGF ve endostatin ekspresyonları araştırıldı.

Çalışmaya katılanlar ÜK hastaları, İBS hastaları ve sağlıklı kontrol olmak üzere 3 grup şeklinde sınıflandırıldı. ÜK tanısı klinik, radyolojik, endoskopik ve histolojik kriterlere göre, İBS tanısı Roma III kriterlerine göre konuldu.[92]

Buna göre;

1- Serum VEGF düzeyi değerlendirildiğinde gruplar arasında (ÜK, İBS, Sağlıklı kontrol) istatistiksel olarak anlamlı fark gözlendi (p=0.011).
2- Serum endostatin düzeyi değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlendi (p=0.001).
3- ÜK hastaları klinik aktivite şiddetine göre hafif-remisyon, orta şiddette hastalık grubu şiddetli hastalık grubu olarak gruplandırıldığında serum VEGF ve endostatin seviyeleri arasında anlamlı fark gözlendi (sırasıyla; p=0.018, p= 0.008).
4- ÜK hastalarında serum VEGF düzeyi ile ÜKAİ, EAİ, ESH, CRP, trombosit ve serum endostatin düzeyi ile pozitif anlamlı korelasyon, albümin düzeyi ile negatif anlamlı korelasyon saptandı.
5- ÜK hastalarında serum endostatin düzeyi ile ÜKAİ, EAİ, ESH, CRP ve serum VEGF düzeyi arasında pozitif anlamlı korelasyon bulundu.
6- ÜK hastalarının aktif ve inaktif mukozaları VEGF ekspresyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aktif mokoza grubu ile inaktif mukoza grubu arasında, aktif mukoza grubu ile İBS grubu arasında stromada, endotelde ve epitelde boyanma şiddeti ve yaygnlığı açısından anlamlı fark gözlendi. İnaktif mukoza grubu ile

İBS grubu arasında stromada boyanma şiddeti ve endotelde boyanma yaygınlığı dışında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi.

7- ÜK hastalarının aktif ve inaktif mukozaları endostatin ekspresyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aktif mokoza grubu ile inaktif mukoza grubu arasında stroma ve endotelde boyanma şiddeti ve yaygılığı açısından anlamlı fark saptanmadı. Hiçbir grupta endostatin epitelde eksprese olmadı. Aktif mukoza grubu ile İBS grubu arasında stroma ve endotelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından anlamlı fark saptandı. İnaktif mukoza grubu ile İBS grubu karşılaştırıldığında stromadaki boyanma yaygınlığı, endoteldeki boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından anlamlı fark saptandı.

Sonuç olarak; ÜK hastalarında serum VEGF ve endostatin düzeyleri ve kolon mukoza örneklerinde VEGF ve endostatin ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığnda anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuç ÜK hastalarında VEGF artışına rağmen mukozal ülserlerdeki iyileşmenin neden yavaş olduğu ve hastalığın kronikliğinin sebebi hakkında fikir verebilir.

7. ÖZET

Ülseratif Kolit Hastalarında Serum Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Endostatin Düzeyleri ile Kolon Mukoza Örneklerinde VEGF ve Endostatin Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Kahramanoğlu Aksoy E., Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Tezi, Ankara, 2009. Potent anjiogenik faktör olan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktorü (VEGF)'nin Ülseratif kolit (ÜK) hastalarında serum düzeylerinin ve doku ekspresyonlarının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. VEGF'nin serum ve doku düzeylerindeki artışına rağmen ÜK ilişkili mukozal hasardaki iyileşmenin neden geç olduğu açıklanamamıştır. Bu çalışmanın amacı ÜK hastalarında serum VEGF ve endostatin düzeylerinin ölçümü, hastalık aktivitesi ve birbirleri ile olan ilişkisinin saptanması, doku VEGF ve endostatin ekspresyonlarının değerlendirilmesi ve elde edilen verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılmasıdır.

Çalışmaya ÜK hastaları (n=39), kontrol grubu olarak da İrritabl Barsak Sendromu (İBS) hastaları (n=28) ve sağlıklı kontrol (SK) (n=15) olmak üzere 3 grup dahil edildi.

Gruplar arası yaş ve cinsiyet dağılımı benzerdi. Ortalama serum VEGF ve endostatin düzeyleri ÜK, İBS ve SK grupları için ölçüldü ve fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla; p=0.011 ve p=0.001). ÜK grubu klinik aktivite şiddetine göre; hafif-remisyon grubu (n=9), orta şiddette hastalık grubu (n=22) ve şiddetli hastalık (n=8) grubu olarak ayrıldığında serum VEGF ve endostatin düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla; p=0.018 ve p=0.008). ÜK hastalarında serum VEGF ve endostatin düzeyi arasında ve serum VEGF ve endostatin düzeyi ile ÜKAİ, EAİ, ESH, CRP arasında pozitif anlamlı ilişki, serum VEGF düzeyi ile albümin düzeyi arasında negatif anlamlı ilişki saptandı.

33 ÜK hastasından 33 aktif mukoza örneği, 19 inaktif mukoza örneği, 24 İBS hastasından normal mukoza örneğinde VEGF ve endostatin

ekspresyonları immünhistokimya yöntemi ile boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından değerlendirildi. ÜK hastaları VEGF ekspresyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aktif mukoza grubu ile inaktif mukoza grubu arasında, aktif mukoza grubu ile İBS grubu arasında stromada, endotelde ve epitelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı için istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). İnaktif mukoza grubu ile kontrol grubu arasında stromada boyanma şiddeti ($p=0.002$) ve endotelde boyanma yaygınlığı ($p=0,035$) dışında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Hiçbir grupta epitelde endostatin eksprese olmadı. ÜK hastaları endostatin ekspesyonları açısından İBS grubu ile karşılaştırıldığında aktif mukoza grubu ile İBS grubu arasında stroma ve endotelde boyanma şiddeti ve yaygınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). İnaktif mukoza grubu ile İBS grubu arasında stromadaki boyanma yaygınlığı ($p=0.044$), endoteldeki boyanma şiddeti ve yaygınlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.012$). Aktif ve inaktif mukoza grupları arasında boyanma yaygınlığı ve şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Bu çalışmada VEGF'nin yanı sıra anjiogenez inhibitörü olan endostatinin de ÜK hastalarında serum ve doku düzeylerinin arttığı gösterildi. Bu sonuç ÜK hastalarında VEGF artışına rağmen mukozal ülserlerdeki iyileşmenin neden yavaş olduğu ve hastalığın kronikliğinin sebebi hakkında fikir verebilir.

Anahtar Sözcükler: Ülseratif kolit, VEGF, endostatin, anjiogenez, ülser iyileşmesi

8. SUMMARY

The Assesment of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Endostatin Levels and the Expressions of VEGF and Endostatin at Colonic Mucosal Samples of Ulcerative Colitis Patients

Kahramanoğlu Aksoy E., Ankara University Faculty of Medicine, Thesis in Internal Medicine, Ankara 2009. Increased serum levels and tissue expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic factor, in patients with active ulcerative colitis (UC) were demonstrated in previous studies. It could not be explained why the healing of UC related mucosal injury is impaired despite the increased serum levels and expressions of VEGF. The purpose of this study is to measure the serum levels of VEGF and endostatin in UC patients, to determine the correlation between disease activity and each other, to assess the tissue expression of VEGF and edostatin and to compare the data with control groups.

3 groups were enrolled to the study as UC patients (n=39), Irritable Bowel Syndrome (IBS) patients (n=28) and healty controls (HC) (n=15).

Age and sex distrubitions were similar between groups. Mean serum VEGF and endostatin levels were measured for UC, IBS and HC groups and the difference was statistically significant (p=0.011 and p=0.001, respectively). UC group was divided to 3 groups as mild-remission (n=9), moderate (n=22) and severe disease groups (n=8) according to clinical activity score. Mean serum VEGF and endostatin levels were statistically significant (p=0.018 and p=0.008, respectively). There were positive significant correlation between serum VEGF and endostatin levels, between serum VEGF and endostatin levels and UCAI, EAI, ESR, CRP levels and negative significant correlation between serum VEGF levels and albumin levels.

VEGF and endostatin expressions were assesed with immunhistochemistry technique in terms of stain intensity and prevalence in 33 active mucosa samples, 19 inactive mucosa samples from UC patients and 24 normal colon mucosa samples from IBS patients. When active and

inactive mucosa groups were compared with IBS group in terms of VEGF expression there were statistically significant difference between active mucosa group and inactive mucosa group, active mucosa group and IBS group in stroma, endothelium and epithelium for stain intensity and stain prevalence ($p<0,05$). There were no statistically significant difference except stromal stain intensity ($p=0.002$) and endothelium stain prevalence ($p=0.035$) between inactive mucosa group and IBS group. There were no epithelial expressions of endostatin in three groups. When UC patients were compared with IBS group in terms of endostatin expression there were statistically significant difference between active mucosa group and IBS group in stroma and endothelium for stain intensit yand stain prevalance ($p<0,05$). There were statistically significant difference between inactive mucosa group and IBS group for stromal stain prevalence ($p=0.044$), endothelium stain intensity and prevalence ($p=0.002$ ve $p=0.012$, respectively). There were no statistically significant difference between inactive and active mucosa groups for stain intensity and prevalence.

In this study it was shown that serum and tissue levels of anjiogenesis inhibitor endostatin were increased in UC patients instead of VEGF levels. This result can account why the healing of mucosal ulcerations were slowly although the increased serum and tissue VEGF levels and the disease chronicity.

Key Words: Ulcerative colitis, VEGF, endostatin, anjiogenesis, ulcer healing

9. KAYNAKLAR

1- Scott MM, Ekbom A. Epidemiology of inflammatory bowel disease. Current Opinion in Gastroenterology 2002;18:416-420.

2- Sandler RS, Eisen GM. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Kırsner JB (ed). Inflammatory bowel disease. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000:89.

3- Jewell DP. Ulcerative colitis. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ (eds), Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. 8th edtion: Saunders, 2006:2499-2548.

4- Tözün N, Hamzaoğlu Över H. İltihabi barsak hastalıklarında etyolojik faktörler. Güncel Gastroenteroloji 1997;1/2:287-294.

5- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic an dizygotic twins: a study of heritability and the influence of smoking. Gut 1998;29:990-996.

6- Probet CS., Chott A., Turner JR., Saubermann LC, Stevens AC., Bodinaku K., Elson CO., Balk SP., Blumberg RS. Persistent clonal expansions of peripheral blood CD4+ lymphocytes in chronic inflammatory bowel disease. J Immun 1996;157:3183-3191.

7- Caradonna L, Amati L, Lella P. Phagocytosis, killing, lymphocyte-mediated antibacterial activity, serum autoantibodies, and plasma endotoxins in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2000;95(6):1495-1502.

8- Tözün N, Atuğ Ö. İltihabi Barsak Hastalıkları. Memik F, Ed. Klinik Gastroenteroloji. Bursa: Nobel & Güneş Kitabevi, 2004:448-461.

9- Hamilton SR, Morson BC. Ulcerative Colitis Pathology. In: Haubrich W, F, Berk JE, (eds). Bockus Gastroenterology. Vol:2 5 th edition Philedelphia: WB Saunders Company, 1995:1326-1337.

10- Stenson WF. Inflammatory Bowel Disease. In: Yamada T (ed). Textbook of Gastroenterology. Vol:2 2nd edition, Philedelphia: JP Lippincott Company, 1995:1748-1806.

11- Aktan H, İltihabi Barsak Hastalığı. In: Aktan H, Aktan B, Alptuna E, Atmaca NS, (eds). Gastroenteroloji. 1. baskı, Ankara: Makro Yayıncılık, 1988:178-190.

12- Seo M, Okada M, Tsuneyoshi. An index of disease activity in patients with ulcerative colitis. A J G 1992;87(8):971-975.

13- Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5 amino salicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of ulcerative colitis; A Randomize Trial. Br Med J 1989;298:82-86.

14- Tözün N, Hamzaoğlu Över H. İltihabi barsak hastalıklarında etyolojik faktörler. Güncel Gastroenteroloji 1997;1/2:287-294.

15- Charles N Bernstein: Osteoporosis and other complications of inflammatory bowel disease. Current Opinion in Gastroenterology 2002;18:428-434.

16- Monsen U, Sorstad J, Hellers G, Johansson C. Extracolonic diagnosis in ulcerative colitis: An epidemiological study. Am J Gastroenterol 1990;85:711-716.

17- Greenstein AJ, Janowiz HD, Sachar DB: The extra-intestinal complications of Crohn's disease and Ulcerative colitis. A study of 700 patients. Medicine 1976;55:401-412.

18- Kiran M. Das. Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel diseae. Dig Dis Sci 1999;14:1-14.

19- Stenson WF. Inflammatory Bowel Diseases. In: Goldman Lee, Ausiello D (eds). Cecil Textbook of Medicine. 23rd edition: Saunders, 2008:1042-1050.

20- Tözün N, Özdoğan ÖC. İnflamatuar Barsak Hastalıklarında Amip İnfeksiyonu. Aktüel Gastroenteroloji ve Hepatoloji 2003:329-335.

21- Sutherland LR, May GR, Shaffer EA. Sulfosalazine revisited: a meta-analysis of 5-aminosalicylic acid in the treatment of ulcerative colitis. Ann Intern Med 1993;118(7):540-549.

22- Stein RB, Hanauer SB. Medical therapy for inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am 1999;28:297-321.

23- Panes J, et al. Comparison of heparin and steroids in the treatment of moderate and severe ulcerative colitis. Gastroenterology 2000;119(4):903-908.

24- Gross V, Andus T, Fischbach W. Comparison between high dose 5 aminosalicylic acid and 6-methylprednisolone in active Crohn's ileocolitis. A multicenter randomized doubleblind study. German 5-ASA Study Group. Z Gastroenterol 1995;33:581-584.

25- Hanauer SB. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med 1996;334(13):841-848.

26- Munkholm P, et al. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn’s disease. Gut 1994;35(3):360-362.

27- Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. Am J Physiol 2002;282: 947-970.

28- Lai R, Estey E, Shen Y, Despa S, Kantarjian H, Beran M, Maushouri T Quackenbuch RC, Keating M, Albitar M. Clinical significance of plasma endostatin in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. Cancer 2002; 94:14-17.

29- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of vascular endothelial growth factor and its receptors. Nat Med 2003; 9: 669-676.

30- Houck K. The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 1991; 5: 1806-1814.

31- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM. Tumor cellls secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983;219: 983-985.

32- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989;246: 1306-1309.

33- Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: Concentration in tumor blood vessels. J Exp Med 1991;174: 1275.

34- Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. J Mol Med 1999; 77: 527-543.

35- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res 2000; 55: 15-36.

36- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single allele. Nature 1996;380: 435-439.

37- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. Eur J Cancer 1996;32A: 2413-2422.

38- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of vascular endothelial growth factor and its receptors. Nat Med 2003; 9: 669-676.

39- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. J Clin Oncol 2005;23: 1011-102.

40- Waltenberger J, Claeson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem 1994;269: 26988-26995.

41- Kimura H, Weisz A, Ogura T, Hitomi Y, Kurashimo Y, Hashimato K D'Acquisto F, Makuuchi M, Esumi H. Identification of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) ancilary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. J Biol Chem 2000;276:2292-2298.

42- Griga T, Tromm A, Spranger J, May B. Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol. 1998 May;33(5):504-508.

43- Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, Majima, Kagiyama M, Kikuchi K. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. Am J Gastroenterol 2001, 96:822-828.

44- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Armellini E, Morera R, Ricevuti L, Cazzola P, Fulle I, Corazza GR. Serum bFGF and VEGF correlate respectively with bowel wall thickness and intramural blood flow in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2004 Sep;10(5):573-577.

45- Griga T, Gutzeit A, Sommerkamp C, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by peripheral blood mononuclear cells in patients with inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Feb;11(2):175-179.

46- Griga T, Voigt E, Gretzer B, Brasch F, May B. Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with

inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology. 1999 Mar-Apr;46(26):920-923.

47- Griga T, May B, Pfisterer O, Müller KM, Brasch F. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology. 2002 Jan-Feb;49(43):116-123.

48- Friesel RE, Macigog T. Molecular mechanisms of angiogenesis: Fibroblast growth factor signal transduction. FASEB J 1995;9:919-925.

49- Gospodarowicz D, Neufeld G, Schwigerer L. Fibroblast growth factor: structure and biological properties. J Cell Physiol 1987 (Suppl) 5: 15-26.

50- Schwigerer L, Neufeld G, Friedman J. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. Nature 1987;325: 257-259.

51- Asahara T, Bauters C, Cheng LP. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. Circulation 1995 (suppl ll) 92: 365-371.

52- Shirasaka T, Iizuka M, Yukawa M, et al. Altered expression of epimorphin in ulcerative colitis. J Gastroenterol Hepatol. 2003;18:570-577.

53- Saito S, Tsuno NH, Sunami E, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol. 2003;38:229-237.

54- Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, et al. Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. Tohoku J Exp Med.2001;195:21-33.

55- Srivastava M, Zurakowski D, Cheifetz P, et al. Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2001;33:548-553.

56- Kitamura S, Kondo S, Shinomura Y, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-met in ulcerative colitis. Inflamm Res. 2000;49:320-324.

57- Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, et al. Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 2004;49:1758-1762.

58- Koutroubakis IE, Xidakis C, Karmiris K, et al. Potential role of soluble angiopoietin-2 and tie-2 in patients with inflammatory bowel disease. Eur J Clin Invest. 2006;36:127-132.

59- Arihiro S, Ohtani H, Hiwatashi N, et al. Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. Histopathology. 2001;39:50-59.

60- Bardin N, Reumaux D, Geboes K, et al. Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2006;12:16-21.

61- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 1997;88: 277-285.

62- Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H, Pihlajaniemi T. The short and long forms of Type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. Am J Pathol 1998;153: 611-626.

63- Bono P, Teerenhovi L, Joensuu H. Elevated serum endostatin is associated with poor outcome in patients with non-Hodgkin's lymphoma. Cancer 2003;97:2767-2775.

64- Feldman AL, Tamarkin L, Paciotti GF, Simpson BW, Linehan WM, Yang JC Fogler WE, Turner EM, Alexander HR, Libutti SK. Serum endostatin levels are elevated and correlated with serum vascular endothelial growth factor levels in patients with stage IV clear cell renal cancer. Clin Cancer Res 2000;6: 4628-4634.

65- Hajitou A, Grignet C, Devy L. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. FASEB J 2002;16: 1802-1804.

66- Kim YM, Hwang S, Pyun BJ. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. J Biol Chem 2002;277:27872-27879.

67- Smith E, Hoffman R. Multiple fragments related to angiostatin and endostatin in fluid from venous leg ulcers. Wound Rep Reg 2005;3:148-157.

68- Deng XM, Khomenko T, Tarnawski AS, Szabo S. Altered angiogenic balance in ulcerative colitis: a key to impaired healing? Biochem Biophys Res Commun. 2006 Nov 10;350(1):147-150.

69- Szabo S, Deng X, Khomenko T, Chen L, Tolstanova G, Osapay K, Sandor Z, Xiong X. New molecular mechanisms of duodenal ulceration. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007;1113: 238–255.

70- Hatoum OA, Binion DG. The vasculature and inflammatory bowel disease: contribution to pathogenesis and clinical pathology. Inflamm Bowel Dis 2005;11:304–313.

71- Koutroubakis IE, Tsiolakidou G, Karmiris K, Kouroumalis EA. Role of angiogenesis in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2006;12:515–523.

72- Lanzarotto F, Carpani M, Chaudhary R, Ghosh S. Novel treatment options for inflammatory bowel disease: targeting alpha 4 integrin. Drugs 2006;66:1179–1189.

73- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003;9: 669–676.

74- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. Nat Med 2006;12: 235–239.

75- Finkelstein SD, Sasatomi E, Regueiro M. Pathologic features of early inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am 2002;31: 133–145.

76- Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. Adv Immunol 1999;73: 369–509.

77- Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunol Today 1995;16: 21–26.

78- Kusumanto YH, Dam WA, Hospers GA, Meijer C, Mulder NH. Platelets and granulocytes, in particular the neutrophils, form important compartments for circulating vascular endothelial growth factor. Angiogenesis 2003;6:283–287.

79- Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. Mayo Clin Proc 2006;81: 1241–1257.

80- Panutsopulos D, Zafiropoulos A, Krambovitis E, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Spandidos DA. Peripheral monocytes from diabetic patients with coronary artery disease display increased bFGF and VEGF mRNA expression. J Transl Med 2003;1: 6–16.

81- Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP. Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2003;62:635–638.

82- Benelli R, Albini A, Noonan D. Neutrophils and angiogenesis: potential initiators of the angiogenic cascade. Chem Immunol Allergy 2003;83: 167–181.

83- Naldini A, Carraro F. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2005;4: 3–8.

84- Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. J Cell Physiol 2001;189:197–206.

85- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. Trends Immunol 2004;25:201–209.

86- Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:593–609.

87- Chidlow J, Langston W, Greer J, Ostanin D, Abdelbaqi M, Houghton J, Senthilkumar A, Shukla D, Mazar A, Grisham M. Differential Angiogenic Regulation of Experimental Colitis. American Journal of Pathology. 2006;169:2014-2030.

88- Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt PJ, Freemont AJ, Brenchley PE. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in synovial fluid. Clin Exp Immunol. 1999 Jul;117(1):171-176.

89- L.F. Brown, K.T. Yeo, B. Berse, T.K. Yeo, D.R. Senger, H.F. Dvorak and L. van de Water, Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing, J. Exp. Med. 1992;176.

90- Bates, D.O., Lodwick, D., Williams, B.Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. Microcirculation 1999;6 (2), 83–96.

91- Bloch W, Huggel K, Sasaki T, Grose R, Bugnon P, Addicks L, Timpl R and Werner S, The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing, FASEB J. 2000;14:2373–2376.

92- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. Gastroenterology. 2006;130:1480-1491. Abstract.

93- Pousa I. D, Mate J, Gisbert J.P. Angiogenesis in inflamatory bowel disease. Eur J Clin Invest 2008; 38():73-81.

94- Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, Marx G, Herzog D, Dubois J, Dubinsky M, Seidman EG. Doppler US in patients with Crohn disease: vessel density in the diseased bowel relects disease activity. Radiology 2000, 217:787-791.

95- Maconi G, Sampietro GM, Russo A, Bollani S, Crisaldi M, Parente F, Dottorini F, Bianchi Porro G: The vascularity of internal fistulae in Crohn's disease: an in vivo power Doppler ultrasoography assessment. Gut 2002,50:496-500.

96- Bousvaros A, Leichtner A, Zurakowski D, Kwon J, Law T, Keough K, Fishman S. Elevated serum vascular endothelial growth factor in children and young adults with Crohn's disease. Dig Dis Sci 1999 Feb;44(2):424-430.

97- Konno S, Iizuka M, Yukawa M, Sasaki K, Sato A, Horie Y, Nanjo H, Fukushima T, Watanabe S. Altered expression of angiogenic factors in the VEGF-Ets-1 cascades in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2004,39:933-939.

98- Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatrmanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. Int j Colorectal Dis 2003,18:418-422.

99- Srivastava m, Zurakowski D, Cheifetz P, Leichtner A, Bousvaros A. Elevated serum hepatocyte growth factor in children and young adults with inflammatory bowel disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2001,33:548-553.

100- Saito S, Tsuno SH, Sunami E, Hori N, Kitayama J, Kazama S, Okji Y, Kawai K, Kanazawa T, Watanabe T, Shibata Y, Nagawa H. Expression of platelet-drived endothelial cell growth factor in inflammatory bowel disease. J Gastroenterol 2003,38:229-237.

101- J. Michaels V, M. Dobryansky, R.D. Galiano, K.A. Bhatt, R. Ashinoff, D.J. Ceradini and G.C. Gurtner, Topical vascular endothelial growth factor reverses delayed wound healing secondary to angiogenesis inhibitor administration, Wound Repair Regen. 2005;13:506–512.

102- Tsiolakidou G, Koutroubakis IE, Tzardi M, Kouroumalis EA. Increased expression of VEGF and CD146 in patients with inflammatory bowel disease. Digestive and Liver Disease 2008;40:673-679.

103- Hebbar M, Peyrat J, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Incresed concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. Arhritis Rheum 2000; 43:889-893.

104- Nagashima M, Asano G, Yoshino S. Imbalance in production between vascular endothelial growth factor and endostatin in patients wit rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2000;27:2339-2342.

105- Ma L. Elliot SN, Cirino G, Buret A, Ignarro LJ, Wallace JL. Platelets modulate gastric ulcer healing: Roleof endostatin an vascular endothelial growth factor release. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98:6470-6475.

106- Guenther U, Herbst H, Bauer M, Isbert C, Buhr HJ, Riecken eo, Schuppan D. Collagen type XVIII/endostatin is differentially expressed in primary and metastatic colorectal cancers and ovarian carcinomas. British Journal of Cancer 2001;85(10):1540-1545.

107- Arthur LG, Schwartz MZ, Kuenzler KA, Birbe R. Hepatocyte growth factor treatment ameliorates diarrhea and bowel inflammation in a rat model of inflammatory bowel disease. J Pediatr Surg. 2004 Feb;39(2):139-143.

108- Kojma T, Watanabe T, Hata K, Nagawa H. Basic fibroblast growth factor enema improves experimental colitis in rats. Hepatogastroenterology. 2007 Jul-Aug;54(77):1373-1377.

109- Sinha A, Nightingale J, West K, Berlanga-Acosta J, Playford R, Epidermal Growth Factor Enemas with Oral Mesalamine for Mild-to-Moderate Left-Sided Ulcerative Colitis or Proctitis N Engl J Med 2003;349:350-357.