



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ANTİ VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME
FAKTÖR MONOKLONAL ANTİKORU
BEVASİZUMAB'IN BÖBREK FONKSİYONLARI
VE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NESLİHAN SOYSAL

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nezih Meydan

AYDIN 2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**ANTİ VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME
FAKTÖR MONOKLONAL ANTİKORU
BEVASİZUMAB'IN BÖBREK FONKSİYONLARI
VE MORFOLOJİSİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. NESLİHAN SOYSAL

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nezih Meydan

AYDIN 2008

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesindeki sonsuz desteklerinden dolayı, bir doktor olarak her zaman örnek aldığım sayın hocam Doç. Dr. Nezih MEYDAN'a, İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve birikimleri ile yetişmemi sağlayan başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Engin GÜNEY olmak üzere İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Zahit BOLAMAN, Prof. Dr. Taşkın ŞENTÜRK, Prof. Dr. Ali Önder KARAOĞLU, Prof. Dr. M.Hadi YAŞA, Prof. Dr. Hulki Meltem SÖNMEZ, Doç. Dr. Gürhan KADIKÖYLÜ, Doç. Dr. Sabri BARUTÇA, Doç. Dr. Yavuz YENİÇERİOĞLU, Doç. Dr. Harun AKAR, Doç. Dr. Vahit YÜKSELEN, Yard.Doç.Dr. İrfan Yavaşoğlu'na, tez çalışmamdaki katkılarından dolayı Doç. Dr.Muharrem BALKAYA, Yard.Doç.Dr. İbrahim METEOĞLU, Yard.Doç.Dr. Cengiz ÜNSAL'a, asistanlık dönemim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ablam Uzm.Dr. Mediha AYHAN başta olmak üzere Uzm.Dr. Adil Çoşkun, Uzm.Dr. Handan Yüçetürk ve Uzm.Dr. Özgür Tanrıverdi'ye ve herkesten çok sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II.	GENEL BİLGİLER	
	1) Anjiogenez.....	2
	2) Tümör Gelişimi ve Anjiogenez.....	2
	3) Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	4
	4) VEGF'in Glomerüler Filtrasyon Bariyeri İçin Önemi.....	6
	5) Anjiogenez İnhibitörleri.....	9
	6) Kanser Tedavisinde Antianjiogenik Ajanlar.....	11
	- VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler.....	11
	- VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri.....	11
	- VEGF'e yönelik monoklonal antikorlar.....	13
	7) Bevasizumab İle Hipertansiyon ve Proteinüri Gelişimi.....	14
III.	GEREÇ VE YÖNTEM	
	1) Deneysel Tasarı.....	17
	2) Biyokimyasal İncelemeler.....	17
	3) İstatistik.....	18
IV.	BULGULAR.....	19
V.	TARTIŞMA.....	29
VI.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	32
VII.	ÖZET.....	33
VIII.	İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	34
IX.	KAYNAKLAR.....	35

TABLO DİZİNİ

Tablo I: Bazı Önemli Anjiogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları

Tablo II: VEGF Reseptörleri

Tablo III: Endotel Hücreleri Üzerine VEGF Etkileri

Tablo IV: Endojen Anjiogenik ve Antianjiogenik Faktörler

Tablo V: Klinikte Kullanılan Antianjiogenik İlaçlar ve Mekanizmaları

Tablo VI: Klinik Çalışmalarda Bildirilen Proteinüri ve Hipertansiyon Sıklıkları

Tablo VII: Tüm Grupların Biyokimyasal Verileri ve Protein/Kreatinin Oranları

Tablo VIII: Üç Günlük Grupta Glomerülde Fokal Nekroz Derecesi

Tablo IX: Üç Günlük Grupta Bowman Kapsül Aralığında Genişleme Derecesi

Tablo X: Üç Günlük Grupta Tübül Epitelinde Dejenerasyon Derecesi

Tablo XI: Üç Günlük Grupta Tübül Epitelinde Nekroz Derecesi

Tablo XII: Üç Günlük Grupta Tübül Dilatasyonu Derecesi

Tablo XIII: Üç Günlük Grupta İnterstisyel İnflamasyon Derecesi

Tablo XIV: Üç Günlük Grupta Konjesyon Derecesi

Tablo XV: Üç Günlük Grupta Damar Duvarında Kalınlaşma Derecesi

Tablo XVI: 21 Günlük Grupta Glomerülde Fokal Nekroz Derecesi

Tablo XVII: 21 Günlük Grupta Bowman Kapsül Aralığında Genişleme Derecesi

Tablo XVIII: 21 Günlük Grupta Tübül Epitelinde Dejenerasyon Derecesi

Tablo XIX: 21 Günlük Grupta Tübül Epitelinde Nekroz Derecesi

Tablo XX: 21 Günlük Grupta Tübül Dilatasyon Derecesi

Tablo XXI: 21 Günlük Grupta İnterstisyel İnflamasyon Derecesi

Tablo XXII: 21 Günlük Grupta Konjesyon Derecesi

Tablo XXIII: 21 Günlük Grupta Damar Duvarında Kalınlaşma Derecesi

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: VEGF sinyal yolağı

Şekil 2: Deney alıŐma Şeması

Şekil 3: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası günlük protein atılımları

Şekil 4: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası protein/kreatinin oranları

Resim 1:  gün 10 mg/kg bevasizumab alan grupta patolojik değerlendirme

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü= VEGF

Kontrol grubu sıçanlar= K

10mg/kg bevasizumab verilen sıçanlar= A

20mg/kg bevasizumab verilen sıçanlar= B

İlaç verilmesi öncesi= sıfırncı (0.) gün

İlaç verilmesinin üçüncü günü= üçüncü (3.) gün

İlaç verilmesinin 21. günü= Yirmibirinci (21.) gün

Vücut ağırlığı= VA

24 saatlik idrar miktarı= İM

24 saatlik idrarda protein = İP

24 saatlik idrarda kreatinin= İK

24 saatlik idrarda kalsiyum= İC

24 saatlik idrarda fosfor= İP

Kan kreatinin= Kreat

Kan üre= Üre

Kan sodyum= Na

Kan potasyum= K

Kan kalsiyum= Ca

Kan fosfor= P

Kan total protein= T.Pro

Kan albumin= Alb

Kan globulin= Glob

GİRİŞ ve AMAÇ

Anjiogenez tüm kanserlerin büyüme, invazyon ve metastaz aşamalarında kritik öneme sahiptir. Anjiogenezin tümör gelişim ve yayılmasında oynadığı hayati rolün gösterilmesi, antianjiyogenik tedavilerin günümüz kemoterapi protokollerine daha sıklıkla girmesine yol açmıştır. Üzerinde en çok çalışılan antianjiyogenetik ajanlar vasküler endotelial büyüme faktör (Vascular Endothelial Growth Factor = VEGF) sinyal yolağını hedef alanlardır. Bu yolda iki ana hedef VEGF ligandları ve VEGF reseptörleridir. VEGF'e karşı rekombinant insan monoklonal antikoru olan bevasizumab; metastatik kolorektal kanser (1-4), küçük hücreli-dışı akciğer kanseri (5-7) ve meme kanseri (8-10) gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde halen kullanılmaktadır. Pankreas kanseri, renal hücreli kanser ve prostat kanseriyle ilgili çalışmalar ise sürmektedir (11). Bevasizumab'ın kanıtlanmış etkinliğinin yanı sıra kendine has yan etkileri de mevcuttur. Belli başlı yan etkileri tromboz, yara iyileşmesinde gecikme, kanama, gastrointestinal perforasyon ve böbrek toksisitesi olarak bildirilmektedir. En belirgin böbrek toksisiteleri ise proteinüri ve hipertansiyondur (12). Böbrek üzerine olan bu yan etkileri değerlendiren çalışmalar halen oldukça yetersizdir. Bu nedenle yan etkilerin hangi mekanizmayla ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir. Bevasizumab kullanan hastalarda bu yan etkilerin gelişimini önleyecek koruyucu bir ajan henüz bildirilmemiştir.

Bu çalışmanın amacı, bir insan VEGF monoklonal antikoru olan bevasizumab'ın böbrek üzerine olan yan etkilerini gözlemleyebileceğimiz deneysel bir sıçan modeli oluşturmak ve sıçan böbreği üzerine olan etkileri doz ve süre bağımlı olarak değerlendirmektir. İnsan anti-VEGF ile sıçanlarda böyle bir modelin oluşturulması, bu tedavi altındaki hastalarda böbreği koruyucu ajanlara yönelik yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

GENEL BİLGİLER

ANJIOGENEZ

Yeni damar yapımı anlamına gelen anjiogenez (neovaskularizasyon) aslında normal ve fizyolojik olarak yara iyileşmesi, embriyogenez, menstrüel siklus için gerekli bir mekanizmadır. Fizyolojik anjiogenez hassas bir şekilde kontrol edilmektedir.

Patolojik anjiogenez ise diyabetik retinopati, hemanjiyom, psöriazis ve kollajen doku hastalıkları (özellikle romatoid artrit) gibi pek çok hastalığın yanı sıra tümör büyümesi ve metastaz gelişiminden de sorumlu tutulmaktadır.

Anjiogenez endotel hücrelerin olgunlaşma, göç ve çoğalması ile seyreden oldukça karışık bir süreçtir. Bu işlem ekstraselüler matriks, solubl faktör ve hücreler arasındaki karşılıklı etkileşimin bir sonucudur. Endotel hücrelerinin bazı faktörlerle uyarılmaları anjiogeneze neden olan birtakım olaylar dizisini de başlatmaktadır. Anjiogenez dinamik bir olay olarak proteolitik enzimlerin belli oranlarda ortama salınması, hücre dışı matriksin bozulması ve yeniden yapılanması ile endotel hücrelerinin mikrovasküler sahadan göç ederek çoğalması gibi süreçler sonunda ortaya çıkar (13). Sonuçta kapiller damarlardaki endotel hücrelerinin proliferasyonu ile mevcut mikrovasküler yataktan yeni kapiller ve kan damarları oluşur.

Anjiogenezi tetikleyen faktörler; tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden ya da kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkabilirler. Oldukça çok olan bu faktörlerin bazıları ve etki mekanizmaları Tablo I'de özetlenmiştir.

TÜMÖR GELİŞİMİ VE ANJIOGENEZ

Patolojik anjiogenez, solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapmasından sorumlu tutulmaktadır. Çoğu insan tümörü başlangıçta aylarca, hatta yıllarca damarsızdır. Tümörler yeni damar yapımını gerçekleştiremedikleri durumda ancak çevredeki damarlardan difüzyon yoluyla beslenir ve en fazla 0,5 – 1 cm³'lük hacme kadar büyüebilirler. Prevasküler dönem olarak adlandırılan bu dönemde hücreler hızla çoğalır, genişler ve vaskularize olur. Eğer yeni damar oluşumu yeterli olmazsa hücreler nekroza uğrar (14). Bu durum mikrometastatik odaklar için de geçerlidir. Belirli bir hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiogenez gereklidir.

Anjiogenik fenotip, anjiogenezi düzenleyen negatif ve pozitif düzenleyiciler arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıktığından, anjiogenez sırasında tümör hücrelerinin

çok miktarda anjiogenik faktörler salgıladıkları kabul edilmektedir. Tümör ilişkili anjiogenez spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna yardım eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlıdır. Solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapma potansiyelleri, bu tümörlerin yeni damar oluşumunu uyarma yeteneği ile ilişkilidir.

Onkolojide; tümör dokusunda gerçekleşen bu patolojik anjiogenez 1970'lerden itibaren ilgi konusu olmuştur (15). Günümüz teknolojiyle birlikte anjiogenez mekanizmaları anlaşılma çabası ve anti-anjiogenik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve antianjiogenik tedavide üzerinde en çok durulanı VEGF'dir.

Tablo I- Bazı Önemli Anjiogenik Faktörler ve Etki Mekanizmaları (16)

FAKTÖR	ETKİ MEKANİZMASI
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Endotelial mitojen, Survival faktör, Permeabilite indükleyici
Temel Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF / FGF-2)	Endotelial mitojen, Anjiogenez indükleyici Survival faktör Flk-1 Ekspresyon indükleyici
FGF-1, FGF-3, FGF-4	Endotelial mitojen Anjiogenez indükleyici
Transforming Büyüme Faktörü - α (TGF-α)	Endotelial mitojen Anjiogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Epidermal Büyüme Faktörü	Zayıf endotelial mitojen VEGF ekspresyonu indükleyici
Hepatosit Büyüme Faktörü / Scatter Faktör (HGF/SF)	Endotelial mitojen, mitojen Anjiogenez indükleyici
Transforming Büyüme Faktörü - β (TGF-β)	Endotelial büyüme inhibisyonu Anjiogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Tümör Nekrosis Faktor - α (TNF-α)	Endotelial mitojen Anjiogenez indükleyici VEGF ekspresyonu indükleyici
Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	Endotelial mitojen Endotelial motilite faktörü Anjiogenez indükleyici

VASKÜLER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (VEGF)

VEGF homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF terimi altı proteinden oluşan bir büyüme faktörü ailesini ifade etmektedir: VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF E ve plasental büyüme faktörü (PlGF).

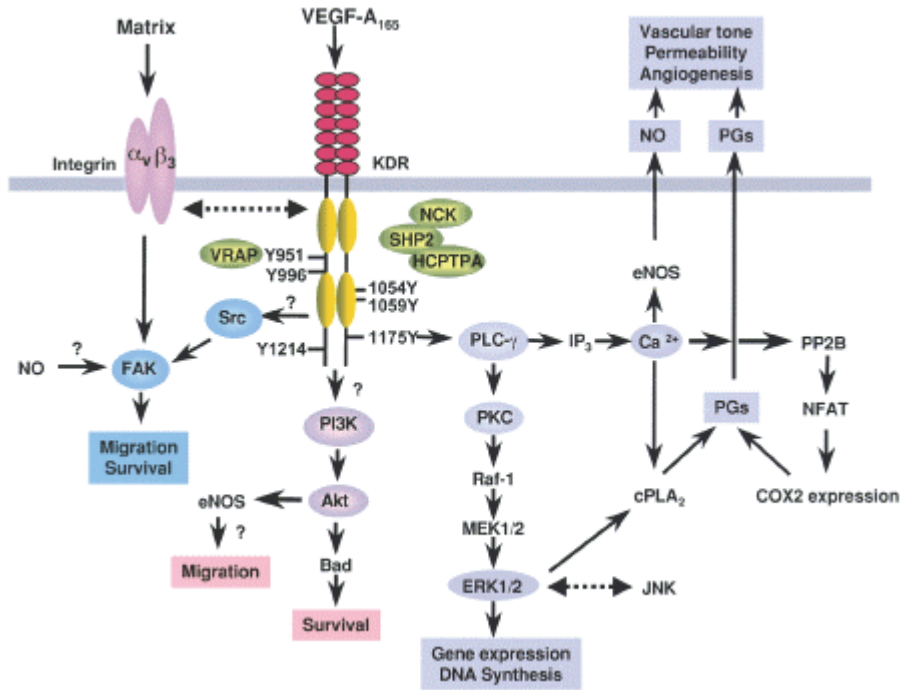
VEGF-A, vasküler endotelyum için yaşamsal öneme sahip 43-46 kDa ağırlığında bir glikoproteindir (17,18). VEGF-A'nın içerdikleri aminoasit sayısına göre adlandırılan üç ana izoformu vardır. VEGF-A'nın izoformları olan VEGF₁₆₅ ve VEGF₁₂₁ dolaşımda bulunan asıl formlardır (19-21). VEGF-A anjiogenezin ana düzenleyicisidir ve vasküler gelişimin yanı sıra patolojik anjiogeneizde de rol oynar. VEGF-C ve VEGF-D ise lenfanjiogeneizde rol oynar (22). PlGF vasküler oluşumun ileri evreleri ve hematopoetik kök hücre toplanması için gereklidir (23).

Tablo II: VEGF Reseptörleri

Reseptör	Etki
VEGFR-1	Gelişimsel (embriyojenik) anjiogenezi uyarır
VEGFR-2	Proliferasyon Migrasyon Sağkalım Anjiogenez
VEGFR-3	Lenfanjiogenezi başlatır

VEGF-A'nın hücre yüzeyinde ki bağlantı noktaları ise VEGFR-1 (Flt-1 ya da fms-benzeri tirozin kinaz), VEGFR-2 (Flk-1/KDR ya da fetal liver kinaz), VEGFR-3 (flt-4) ile nörofilin-1 ve nörofilin-2 koreseptörleridir (Tablo II). VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücreleri üzerinde iken VEGFR-3 lenf damarları üzerinde bulunmaktadır (24-25). Tüm bu reseptörler endotel hücrelerinde transmembran proteini olarak bulunurlar ve VEGF ekspres eden hücrelerle yakın komşuluk gösterirler. Bu komşuluk VEGF'ün jukstakrin/parakrin sinyal yolağıyla çalıştığını düşündürmektedir (15). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfolipaz-C, fosfoinositol-3 kinaz ve *ras* GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon, ve diferansiyasyonunu sağlar (26) (Şekil 1). Nitrik oksit (NO) ise anjiogenezin VEGF-bağımlı

bir mediyatördür. VEGF'in NO sentez enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşan NO endotel hücre migrasyonunda rol alır (27,28). VEGF düzeyi, başta RAS, SRC ve HER-2 onkogenleri olmak üzere, p53 gen mutasyonu, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, FGF-4, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α ve NO gibi birçok endojen ajan ile düzenlenmekte ve tümör hücrelerinde VEGF ekspresyonu artmaktadır. Düşük glikoz seviyesi, oksidatif stres ve özellikle hipoksik ortamda düzeyi hızla artan hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1) de VEGF salınımında etkili rol oynamaktadır (29). Ayrıca, VEGF muhtemel temel anjiogenik faktör olma özelliği yanında; VEGF' e maruz kalan damarlarda, endotel hücreleri arasında fenestrasyon, vesiküler organeller ve transselüler gap oluşumuna olanak sağlayarak vasküler permeabiliteyi artırır (30). VEGF, endotel hücreleri için migratuar özelliğinin yanı sıra; hücre dışı matriks yıkımından sorumlu olan matriks metalloproteazlar ile urokinaz ve doku tipi plazminojen aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (31). VEGF'ün endotel hücreleri üzerine olan etkileri Tablo III'de özetlenmiştir.



Şekil 1: VEGF Sinyal Yolağı

Serumda fizyolojik düzeyde VEGF bulunmasının vasküler endotelial hücre homeostazı için çok önemli olduğu düşünülmektedir (32). VEGF, endotel hücresinde nitrik oksit (NO) ve vazodilatör prostasiklinleri indükleyerek vasküler tonusu ve buna bağlı olarak kan basıncını düşürür. VEGF'ün reseptörüne bağlanması endotel hücresinde sitozolik kalsiyum artışına yol açar. Bu kalsiyum artışının tetiklediği EDRF (endothelium-derived relaxing factor) ve NO salınımı vazodilatasyon ve vasküler tonusta düşme ile sonuçlanır. VEGF'in vasküler endotel için yaşamsal bir faktör olarak önemi gayet iyi anlaşılmış olmasına karşın, böbrek glomerüler vasküler endotelinin düzenlenmesindeki rolü tam olarak açıklanamamıştır.

Tablo III: Endotel Hücreleri Üzerinde VEGF Etkileri

Fonksiyon	Mekanizma
Proliferasyon	Mitojen-bağımlı protein kinaz aktivasyonu
Geçirgenlik	Vezikovasküler organeller Endotelial fenestrasyonlar Bitişik endotel hücreleri arasındaki bağlantıların açılması
İnvazyon	Metalloproteinazlar uPA, uPAR, TTPA'nın indüksiyonu
Migrasyon	FAK, p38 ve nitrik oksit aktivasyonu
Sağ kalım	P13K/Akt, Bcl2, A1, Survivin, XIAP ya da FAK indüksiyonu Kaspazların inhibisyonu
Aktivasyon	İntegrin ekspresyonunun up-regülasyonu Hücre sitoskeletonun değişmesi

VEGF'ÜN GLOMERÜLER FİLTRASYON BARIYERİ İÇİN ÖNEMİ

Böbrekte filtrasyon işlemini gerçekleştiren fonksiyonel birim olan glomerül, afferent ve efferent arteriyollerin oluşturduğu yoğun bir kapiller yapı yumağıdır. Glomerüler filtrasyon bariyeri, glomerül epitelyum hücreleri (podositler), delikli bir glomerüler kapiller endotel sistemi ve araya giren glomerül bazal membranından oluşur.

Glomerülogenezis üzerine yapılan çalışmalarda VEGF-A'nın glomerüler filtrasyon bariyerinin kurulması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (33). Bu bulgularla uyumlu olarak, gelişmekte olan glomerülde podositler 165 izoformu baskın olmak üzere VEGF-A'nın tüm izoformlarını bulundurlar (34).

Diyabetik nefropati, trombotik trombositopenik purpura ve glomerülonefrit gibi çeşitli hastalıklarda, böbrek hasarı sırasında VEGF ekspresyonunun azaldığı (35-37) ve hayvan çalışmalarında hasarlı böbreğe ekzojen VEGF₁₂₁ verilmesinin böbrek fonksiyonu ve histolojisinde düzelme sağladığı (38,39) gösterilmiştir.

Sugimoto ve arkadaşlarının (40) farelere anti-VEGF antikorunu vererek yaptığı bir çalışmada; VEGF inhibisyonunun proteinüri gelişimi, glomerüler endotel hücre ayrılması ve glomerüler önemli bir protein olan nefrinin baskılanmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada beşer farelik gruplara, fare anti-VEGF antikor ya da sFlt-1/Fc uygulanması sonrası proteinüri ölçümleri ve patolojik olarak böbreklerin immünfloresan, western blotting ve transmisyon elektron mikroskopi yöntemleri ile incelemeleri yapılmıştır. Sonuçta, VEGF blokajının glomerüler endotel hücre hasarı yaparak proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir. Hem fare anti-VEGF antikor, hem sFlt-1/Fc verilen grupta proteinüri ilaç uygulanmasının üçüncü saatinde başlamış ve 24. saatte kaybolmuştur. İmmünfloresan ve western blot ile inceleme, glomerüler slit diyafram ilişkili protein nefrinin ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Slit diyafram, glomerüler bazal membranın üzerinde ayaksa çıkıntıları birleştiren ince bir yapıdır. Varlığı on yıllardır tanımlanmış olmasına karşın, glomerüler filtrasyondaki rolü hala tam olarak bilinmemektedir (41). Transmisyon elektron mikroskopi ile inceleme sonucu glomerüler endotel hücre hipertrofisi, hasarı, glomerüler bazal membranda ayrılma ve slit diyaframlarda hasarlanma gösterilmiştir.

Maynard ve arkadaşlarının (42) benzer bir çalışmasında, sıçanlarda dolaşımdaki VEGF-A'nın anti-VEGF-A antikorları ya da soluble VEGF-R1 (sFlt-1) enjeksiyonları ile nötralize edilmesinin glomerüler hasarlanma ve proteinüri gelişimiyle sonuçlandığı gösterilmiştir.

Progresif kresentik glomerülonefritli farelerde, soluble VEGFR-1 (sFlt-1) overekspresyonu yoluyla VEGF blokajı renal hasarı hızlandırmaktadır (43). Ayrıca VEGF-A spesifik bir aptamer ile glomerüler kapillerlerin tamirinin önlenmesi, hızlı ve masif tübülointerstisyel fibrozis gelişimine yol açmaktadır. Ostendorf ve arkadaşları (44) in vivo olarak VEGF inhibisyonu yaptıkları bir çalışmada, sıçanları normal, mezangioproliferatif nefritli, pasif Heyman nefritli ve puromisin aminonükleozid nefrozisli grup olarak dört gruba ayırmışlar ve farklı sürelerde VEGF₁₆₅ aptameri uygulamışlardır. Normal sağlıklı sıçanlarda 21 gün boyunca 5 mg/kg VEGF₁₆₅ aptameri uygulanması sonucu ne proteinüri ne de herhangi bir elektron mikroskopik glomerül hasarına rastlanmazken, mezangioproliferatif nefritli olan sıçanlarda uygulamanın 6. gününde glomerüler endotel rejenerasyonunda azalma ve endotel hücre ölümünde artma görülmüştür. Tüm bu bulgular VEGF₁₆₅'in glomerüler hastalıkta endotel hücre sağkalımı ve tamiri için çok önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Bunun aksine, kemirgen VEGF nötralizan antikorunu, yüksek proteinli diyetle beslenen farelerde ve diyabetik nefropatili sıçan ve farelerde erken renal hasarı iyileştirmiştir (45-49). Bu

çalışmalar VEGF yoluyla NO aktivasyonunun erken renal hasarlanmada rolü olduğunu düşündürmektedir.

VEGF-A ve glomerüler filtrasyon bariyerinin gelişimi ile ilgili olarak ise, kemirgen embriyonik kök hücrelerinde homolog rekombinasyon kullanılarak oluşturulan VEGF-A allelinden yoksun fareler embriyogenezin erken evresinde vasküler oluşumu gerçekleştiremeyerek ölmüşlerdir (50,51). Kitamoto ve arkadaşları (52) yaptıkları bir çalışmada kemirgen yavrularına doğdukları gün anti-VEGF antikor vermişler ve elektron mikroskopik olarak glomerüler kapiller gelişiminin büyük ölçüde olumsuz etkilendiğini, kapiller lümenlerin daha küçük ve oluşumlarını tamamlayamamış olduklarını göstermişlerdir. Başka bir çalışmada Gerber ve arkadaşları (53) farelere post-natal 1. ya da 8. günlerde soluble VEGF reseptör şimerik proteini, mFlt(1-3)-IgG injekte etmişlerdir. Tedavinin 4. ya da 5. günlerinde yapılan histopatolojik inceleme hiposelülarite, endotel hücre kaybı, mezangial matriks birikimi ve proksimal tübüllerde protein damlacıkları gibi belirgin glomerüler kusurlar saptamıştır. Glomerüler kapiller sayısı da azalmıştır. Farelerde podosit-spesifik VEGF-A delesyonu oluşturan bir sistemle yapılan çalışmada, podositte VEGF-A'nın tüm izoformlarından yoksun fareler doğumda hidrops ve böbrek yetmezliği nedeniyle ölmüşlerdir. Bu farelerde fonksiyonel glomerüler filtrasyon bariyerinin gelişmediği gösterilmiştir (54,55).

Çalışmalarda post-natal dönemdeki VEGF gerekliliğinin erişkin dönemde kaybolduğu gösterilmiştir. Sağlıklı erişkin böbrekte ise VEGF'in rolü net olarak bilinmemektedir. VEGF erişkin dönemde de böbreklerde glomerül viseral epitelyal ve mezangial hücrelerinden salınmaya devam etmekte ve hastanın renal fonksiyonuna bağlı olarak idrarla atılmaktadır (56). Yaşlanan sıçanlarda glomerüler VEGF düzeyi azalır. Bu azalma glomerüler kapillerlerin kaybı ve glomerüloskleroz gelişimiyle birliktedir. Bu gözlem endotel hücrelerin devamlılık için de VEGF fonksiyonuna gereksinim duyduklarını düşündürmektedir (57).

Deneyssel ve klinik çalışmalarda bevasizumab veya anti-VEGF kullanımına bağlı gelişen hipertansiyon ve proteinürinin hangi mekanizmalarla ortaya çıktığı ise henüz bilinmemektedir. Ancak çeşitli çalışmalarda VEGF'ün hipotansif etkisi gösterilmiştir. VEGF arteriyol ve venülleri dilate etmektedir. İntravenöz VEGF uygulamasının sıçanlarda ortalama arteriyal kan basıncında doz-ilişkili bir düşme ve kalp hızında kompensatuvar bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (58,59). Hipotansiyonun kısmen nitrik oksit aracılıklı venöz dolaşım azalmasına, kısmen prostasiklin sentezinin tetiklenmesine bağlı olduğu sanılmaktadır. Bevasizumab ile VEGF inhibisyonunun, endotelial nitrik oksit sentetaz enziminin inhibisyonu yoluyla hipertansiyona yol açtığı tahmin edilmektedir.

VEGF-A, insan endotel hücrelerinde anti-apoptik proteinler Bcl-2 ve A1 ekspresyonunu indükleyerek, endotel hücreleri için yaşamsal faktör olarak rol oynar. Erişkin glomerülde de podositler VEGF-A eksprese etmeye devam ederler. Bu ekspresyon VEGF'ün glomerüler filtrasyon bariyerinin

devamlılığında rol oynadığını düşündürür. Glomerüler kapiller fonksiyonu VEGF'nin katı gen-doza bağımlı kontrolü altındadır. Bevasizumab ile VEGF inhibisyonu sonrası renal podosit fonksiyonu ve renal damar yapısı bozulur. Renal podositlerdeki VEGF düzeyi %50'ye düştüğünde, glomerüler endotel hücreleri şişer, kapiller döngü bozulur ve proteinüri gelişir (41).

ANJİOGENEZ İNHİBİTÖRLERİ

Vücutta her sistemin olduğu gibi anjiogenezin de inhibitörleri mevcuttur. Anjiogenez; aktivatörlerin/inhibitörlerin arasındaki dengeye bağılı olarak aktive veya inhibe olmaktadır. Bu sistemin aktivatörleri ve inhibitörleri anjiogenik ve anti-anjiogenik ajanlar başlığı altında Tablo IV'de özetlenmiştir (60).

Anjiogenik faktörler ile anti-anjiogenik faktörler arasındaki bu denge tümör dokusu gibi hızla çoğalan hücrelerin bulunduğu ortamda hücrelerin çoğalması ve yaşam sürelerinin uzaması için temel unsur teşkil eden anjiogenez lehine bozulmaktadır. Bu bozulan dengeyi tümör gelişimi aleyhine çevirebilmek için anjiogenik faktörlerin inhibisyonu, endostatin ya da anjiostatin gibi doğal anti-anjiogenik faktörlerin uygulanması, endotel hücrelerinin inaktivasyonu ya da matriks metalloproteinaz inhibitörleri gibi yeni damarların hücre dışı matriks ile etkileşimini bozacak moleküllerin uygulanması şeklinde farklı tedavi stratejileri önerilmiştir.

Tablo IV- Endojen Anjiogenik ve Antianjiogenik Faktörler (60)

Anjiogenik Faktörler	Antianjiogenik Faktörler
VEGF	Trombospondin-1 ve -2
bFGF	Endostatin
TGF- α ve β	Angiostatin
PDGF	Interferon- α , - β
HGF/SF	İnterlökin -12
TNF- α	Platelet Faktör -4 fragmanı
EGF'ler	Angiopoietin-2
Plasental Büyüme Faktörü	İnsan Makrofaj Metalloelastazı
Doku Faktörü	TIMP-1 ve -2
IL-6 ve IL-8	VEGF İnhibitörü
Angiogenin	Vasostatin
Angiopoietin-1	Anti-thrombin III fragmanı
Siklooksijenaz – 2 (COX-2)	
Nitrik Oksit (NO)	

KANSER TEDAVİSİNDE ANTI-ANJİOGENİK AJANLAR

Tümörler, anjiogenik faktörlerin üretimiyle karakterize dokular olduklarından, bunların ekspresyonunun ya da etkilerinin inhibisyonu tümör anjiogenezinin baskılanmasında dolaylı, ancak etkili bir yaklaşımdır. Öncelikli hedefler içinde en çok tercih edilenler VEGF ve VEGF reseptörleridir (Tablo V).

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede inhibe edilerek VEGF in etkinliği önlenmektedir (61). Bu mekanizmaları VEGF inhibitörleri, VEGFR inhibitörleri ve monoklonal antikorlar olarak üç grupta toplayabiliriz.

VEGF reseptörlerine yönelik tedaviler

VEGF sistemi aynı zamanda monoklonal antikorlarla yada spesifik tirozin kinaz inhibitörleri aracılığıyla inhibe edilebilir. Bunlar anjiogenezde direk veya indirek olarak rol alan VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (Flk-1), Tie-1 ve Tie-2 gibi reseptörleri hedef alan küçük moleküllerdir. Bunların içinde ise en önemlisi, özellikle tümör dokusunda endotel hücre proliferasyonu ve kemotaksisinden sorumlu olan VEGFR-2 (Flk-1)'dir (20).

VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörleri

SU5416, klinik olarak test edilmiş ilk VEGF reseptör tirozin kinaz inhibitörüdür. Parenteral uygulanan kinolon derivesi olarak *SU5416*, VEGFR-2 (Flk-1)'i inhibe eder (62). Kısa yarılanma ömrü, aktif plazma konsantrasyonu için sık aralıklarla kullanılması, ve özellikle gemcitabine/cisplatin kemoterapisi ile kombine kullanımda ortaya çıkan pulmoner emboli, myokardiyal enfarktüs ve serebrovasküler olay geliştirmesi bu ajanla ileri çalışmalar yapılması konusunda cesaret kırıcı olmuştur (63).

SU6668, VEGF, bFGF ve PDGF reseptörlerini inhibe eden oral kullanımlı anti-anjiogenik ajandır (64). Günde tek dozluk uygulamalar hastalar tarafından tolere edilebilirken doz arttıkça nefes darlığı, göğüs ağrısı ve perikardiyal effüzyona sebep olabilmektedir.

SU11248 (Sunitinib), ise geniş spektrumlu oral tirozin kinaz inhibitörüdür ve VEGF, PDGF, c-Kit ile Flt-3 kinaz aktivitesini inhibe eder. Böbrek kanseri ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde etkiliği gösterilmiştir (65).

Tablo V- Klinikte Kullanılan Antianjiogenik İlaçlar ve Mekanizmaları

İLAÇ	HEDEF	KLİNİK ÇALIŞMALAR
VEGF' i hedef alan monoklonal antikorlar		
Bevasizumab (Avastin®)	VEGF	Faz I, II, III
VEGF-Trap	VEGF	Faz I
VEGFR-2 yi hedef alan antikorlar		
IMC-ICII	VEGFR-2	Faz I
Reseptör tirozin kinaz inhibitörleri		
SU5416	VEGFR-2	Faz I, II, III
SU6668	VEGFR-2, bFGFR, PDGFR	Faz I, II
SU11248	VEGFR-2, PDGFR	
PTK787/ZK22854	VEGFR-1, VEGFR-2	Faz I
ZD6474	VEGFR-2, EGFR	Faz I, II,
CP-547,632	VEGFR-2, EGFR, PDGFR	Faz I
Endotel hücre proliferasyonu inhibitörleri		
ABT-510	Endotelial CD-36	Faz I, II
Angiostatin		Faz I,
Endostatin		Faz II
TNP-470	Met-aminopeptidaz, CDK-2	Faz I
Thalidomide	TNF- α oluşumunun inhibisyonu	Faz I, II, III
İntegrin aktivitesinin inhibisyonu		
Vitaxin	İntegrin $\alpha\beta3$	Faz I, II
Medi-552	İntegrin $\alpha\beta3$	Faz I
Cilengitide	İntegrin $\alpha\beta3$	Faz I
Damar ağını hedef alan ilaçlar		
Combretastatin A4	Endotelial tubulin	Faz I
AVE8062A	Endotelial tubulin	Faz I
ZD6126	Endotelial tubulin	Faz I
DMXAA	TNF- α oluşumunun uyarımı	Faz I

PTK787/ZK222584, oral VEGFR-1 ve 2 reseptör inhibitörüdür. İntratümöral mikrovasküler dansitede dramatik azalmaya (%30-40 arası) yol açar. Hepatik metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda kan akımını belirgin azalttığı gözlemlenmiştir. Kombine faz II ve III çalışmaları sürmektedir (66).

ZD6474(vandetanib), ise hem VEGFR2 hem de Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor=EGFR) inhibitörüdür. Deneysel çalışmalarda yumuşak doku sarkomlarında etkinliği *invivo* ve *invitro* olarak gösterilmiş olmasına karşın, tedavi protokollerine girmesini sağlayacak klinik çalışmalar henüz sürmektedir (67).

CP-547,632, ise selektif VEGFR-2 tirozin kinaz inhibitörüdür. Hayvan deneylerinde tümör büyümesinin önlenmesinde çok olumlu sonuçlar alınmıştır (68). Ancak çok merkezli bir FazII çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri hastalarında paklitaksel ve karboplatin ile kullanımı tedaviye yanıt oranında artış sağlamamıştır (69).

VEGF'e yönelik monoklonal antikorlar

VEGF-trap

Potent VEGF blokörüdür. Monoklonal antikorlara göre VEGF' e olan affinitesi çok daha yüksektir. Kanser tedavisinde klinik kullanımıyla ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (70).

rhuMab VEGF (Bevasizumab, Altuzan[®], Avastin[®])

Rekombinant insan anti-VEGF-A monoklonal antikorunu olan bevasizumab'ın, faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği saptanmıştır. Sağkalımı uzattığı çeşitli faz III çalışmalarda klinik olarak kanıtlanmış ve kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk antianjiogenik ajandır (2). Bevasizumab VEGF'e bağlanarak endotel hücre yüzeyinde VEGF ile reseptörleri (Flt-1 ve KDR) arasındaki etkileşimi engeller. Bevasizumab + FOLFOX4 (5-FU, lökoverin ve oksaliptatin) alan kolorektal kanser hastalarında, yalnızca FOLFOX4 alan hastalara kıyasla tüm sağkalımda anlamlı artış olduğunun gösterilmesinin ardından, 2006'da kullanım onayı metastatik kolon ve rektum kanserinin ilk ya da ikinci sıra tedavisi olarak genişletilmiştir. Metastatik akciğer kanserinde; bevasizumab ile birlikte karboplatin ve paklitaksel kombinasyon kemoterapisi alan hastalarda, yalnızca karboplatin ve paklitaksel kemoterapisi alan hastalara göre, sağkalımda anlamlı artış sağlandığı gösterilmiştir (71). Bu kanıta dayanarak rezeke

edilemeyen, lokal-ileri, rekürren ya da metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanserinin ilk sıra tedavisinde karboplatin ve paklitaksel ile kombinasyon rejiminde kullanım onayı almıştır. Günümüzde ileri evre metastatik meme kanserinin tedavisinde de kombinasyon tedavilerine giren bevasizumabın; renal hücreli karsinom, pankreas kanseri, over kanseri ve hormona yanıt vermeyen prostat kanserinde klinik etkinliğine dair çalışmalar halen sürmektedir (72).

Bevasizumab, metastatik kolorektal kanser kombinasyon tedavisinde 5 mg/kg iki haftada bir (2), küçük hücreli dışı akciğer kanseri kombinasyon tedavisinde 15 mg/kg üç haftada bir (73), metastatik meme kanser kombinasyon tedavisinde 15 mg/kg dozunda iki ya da üç haftada bir (8) kullanılmaktadır.

Bu klinik çalışmalar kombinasyon tedavisine bevasizumab eklenmesinin, kemoterapinin yalnız başına kullanımına kıyasla toksisitede belirgin artışa neden olmadığı ve iyi tolere edildiğini göstermiştir. Bu çalışmalarda ortaya çıkan en belirgin yan etkiler hipertansiyon, proteinüri, tromboz, kanamaya meyil, yara iyileşmesinde gecikme olarak ortaya çıkmaktadır. Daha nadiren hayatı tehdit edici olaylar (arteriyel trombotik olaylar, gastrointestinal perforasyon ve masif hemoptizi) bildirilmiştir. Yan etkiler açısından yüksek risk taşıyan hastaların yakın takibi önerilmektedir.

BEVASİZUMAB İLE HİPERTANSİYON VE PROTEİNÜRİ GELİŞİMİ

Bevasizumab'ın bilinen başlıca böbrek yan etkileri arasında proteinüri ve hipertansiyon gelişimi dikkat çekmektedir. Bu yan etkiler yedi klinik randomize çalışmayı (74-89) değerlendiren bir meta analizde değerlendirilmiştir (81).

Bu çalışmalardaki herhangi bir derece proteinüri sıklıkları Tablo VI'da verilmiştir. Düşük doz bevasizumab alan hastalarda herhangi bir derece proteinüri sıklığı %21-41 arasında iken, yüksek doz alan grupta %22-63 arasında değişmiştir. Derece III proteinüri (protein>3,5 gr/gün) kontrol grubundaki 872 hastanın yalnızca birinde saptanırken (%0,1), düşük doz bevasizumab alan 597 hastanın 6'sında (%1,0) ve yüksek doz bevasizumab alan 381 hastanın 7'sinde (%1,8) gelişmiştir. Bu çalışmalarda bevasizumab kullanımına bağlı artmış proteinüri riski istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Düşük doz bevasizumab alan hastalarda hipertansiyon sıklığı %2,7-32 arasında iken, yüksek doz alan grupta %17,6-36 arasında rapor edilmiştir. Kontrol grubunda 872 hastadan 15'inde (%1,7) III. derece hipertansiyon gelişirken, bevasizumab kullanılan hastalarda düşük doz grubunda 597 hastadan 52'sinde (%8,7) ve yüksek doz grubunda 381 hastadan 61'inde (%16,0) III. derece hipertansiyon gelişmiştir. Bevasizumab anlamlı derecede artmış hipertansiyon riskiyle ilişkili bulunmuştur. Bevasizumab alan hastaların beşinde hipertansiyon nedeniyle tedavi sonlandırılmıştır.

Tablo VI. Klinik Çalışmalarda Bildirilen Proteinüri ve Hipertansiyon Sıklıkları (81)

Yayın	Odak	Kemoterapi	Proteinüri (%)			Hipertansiyon (%)		
			Kontrol	Düşük doz	Yüksek doz	Kontrol	Düşük doz	Yüksek doz
Kabbinavar et al, 2003	Kolorektal	FU/LV	11	23	28	3	11	28
Kabbinavar et al, 2005	Kolorektal	FU/LV	19	41		5	32	
Hurwitz et al, 2004	Kolorektal	IFL	21,7	26,5		8,3	22,4	
Johnson et al, 2004	KHDAK	Karboplatin, paklitakel	2	21	42	3,1	15,6	17,6
Miller et al, 2005	Meme	Kapesitabin	7,4		22,3	2,4		23,5
Yang et al, 2003	Renal	Yok	38	41	62,7	0	2,7	35,9
Kindler et al, 2005	Malign Mezotelyoma	Gemcitabin, sisplatin	23		36	6		28

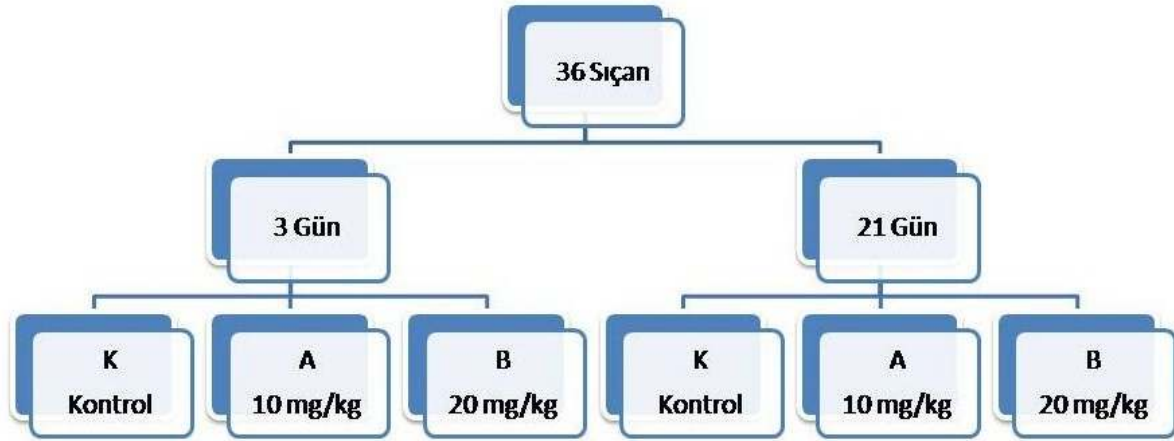
Klinikte, bevasizumab'a bağlı hipertansiyon oral antihipertansif ilaçlarla düzenlenmektedir (82,83). Bu sekonder hipertansiyonun tedavisi için seçilecek antihipertansif ilacın hangisi olması gerektiği konusu halen tartışmalıdır (84). Ancak sıklıkla anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI) kullanılmaktadır.

Proteinüri durumunda genel yaklaşım anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI) ya da anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB) kullanmaktır. Ancak bir hayvan deneyinde, enalapril (bir ACEI) ve kandesartan (bir ARB) verilmesinin, sıçanlarda endojen VEGF ligandını ve VEGF ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (85). Yani anti-VEGF tedavisine bağlı proteinüri durumunda ACEI ya da ARB'lerin etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu durumda proteinüri gelişimi durumunda seçilecek böbrek koruyucu ajanın hangisi olması gerektiği sorusu cevaplanmayı beklemektedir. Bu ajanın bevasizumab'ın yan etkisine karşı böbreği koruyucu etkisi yanında, kemoterapi ilaçlarının kanser hücreleri üzerine olan etkilerini de engellememesi gerekmektedir. Bizim bu çalışmayı planlarken amacımız böbrek koruyucu ajan seçimine ışık tutabilecek çalışmaların düzenlenebilmesi için öncül bir deneysel sıçan modeli oluşturmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyel Tasarı

Araştırmamız için toplam 36 adet erişkin dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Genel çalışma şeması Şekil 2’de gösterilmiştir. İlaç olarak Altuzan (4 ml çözelti içinde 100 mg bevasizumab içeren flakon, Roche) sıçanlara kuyruk venlerinden intravenöz olarak verildi. Sıçanlar kontrol (K), 10mg/kg bevasizumab verilecek grup (A) ve 20 mg/kg bevasizumab verilecek grup (B) olarak üç gruba ayrıldı. Altışar sıçandan oluşan ilk K, A ve B gruplarının ilaç verilmesinin üçüncü günü, yine altışar sıçandan oluşan ikinci K, A ve B gruplarının ilaç verilmesinin 21. günü değerlendirilmesi planlandı. 10 mg/kg dozu için 0,4 ml Altuzan+ 0,6 ml serum fizyolojik (SF) çözeltisi, 20 mg/kg dozu için 0,6 ml Altuzan+ 0,6 ml SF çözeltisi ve kontrol grubu için yalnızca SF hazırlanıp hayvanların canlı ağırlıkları tartılarak 1 ml/kg dozunda verildi. Çalışmamız için Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı alındı. Çalışma için herhangi bir kuruluştan proje desteği alınmadı.



Şekil 2: Deney Çalışma Şeması

Biyokimyasal ve Patolojik İncelemeler

İlaç öncesi, ilaç sonrası üçüncü ve ilaç sonrası 21. Günler proteinüriyi saptamak amacıyla 24 saatlik idrarları, böbrek fonksiyon testleri çalışılmak üzere serumları toplandı. Yirmi dört saatlik idrar toplamak için sıçanlar metabolik kafeslere konuldu. Kanlar intrakardiyak yöntemle alındı. Günlük idrar miktarları ölçüldü ve 24 saatlik idrarda protein, kreatinin, kalsiyum ve fosfor düzeyleri çalışılarak protein/kreatinin oranları hesaplandı.

Üçüncü ve 21. günlerde sıçanlar sakrifiye edilerek böbrekleri patolojik olarak incelendi. Patolojik değerlendirme için doku örnekleri %4'lük nötral tamponlu formalinde 24 saat fikse edildi. Rutin doku takip işlemi sonrası hazırlanan parafin bloklardan 4µm kalınlığında kesitler alınarak hemotoksilen eozin ile boyandı. Işık mikroskopu ile incelenen örneklerde glomerüloskleroz, glomerülde fokal nekroz, bowman kapsül aralığında genişleme, tübül epitelinde dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, tübül dilatasyonu, interstisyel inflamasyon, konjesyon, damar duvarında kalınlaşma ve interstisyel fibrozis yönünden değerlendirme yapıldı. Değerlendirmelerde hiç bulgu yok ise (-), bulgu var ise kendi içinde hafif (+), orta (++) , şiddetli (+++) olarak derecelendirildi.

İstatistik

Her iki ana gruptaki alt grup sayısal değişkenleri için ortanca değerleri kullanıldı. Analizler her iki ana grupta (üç ve 21 günlük gruplar) hem alt gruplar içinde (K, A ve B alt grupları) 0. gün ile ilaç sonrası üçüncü veya 21. günler arasında hem de üç ve 21 günlük alt gruplar arasında ayrı ayrı olarak yapıldı. Alt gruplar arasında hem başlangıç hem de ilaç uygulanması sonrası değerler arasında farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis testiyle değerlendirildi. Alt gruplar arası ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanıldı. Sıfırıncı gün ile üçüncü veya 21. gün değerleri arasında grup içi karşılaştırmalar Wilcoxon signed rank testi ile yapıldı.

Patolojik inceleme sonuçlarının alt gruplardaki boyanma özelliklerinin gösterilmesi için 3x4 çapraz tabloları kullanıldı. Alt gruplar arası patolojik değerlendirmeler için oransal analiz yöntemleri kullanıldı. Ki-kare test koşullarının sağlanamadığı durumlarda tablolara uygun dönüşümler yapılarak Fisher's Exact test koşulları sağlandı.

Alt gruplar içi ikili karşılaştırmalarda 2'li 3 analiz yapılmasından doğabilecek hatalı anlamlılık olasılığını düşürmek amacıyla Bonferroni düzeltmesi uygulanılarak anlamlılık koşulu $p < 0.015$ 'e çekildi. Diğer tüm değerlendirmelerde ise $p < 0.05$ olması koşulu arandı. Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 14 programıyla yapıldı.

BULGULAR

İlaç Uygulaması Sonrası Genel Gözlem

Bevasizumab verilmesi sonrası tüm gruplarda sıçanların genel durumları iyi seyretti. Görünüm ve iştahları normaldi. Kilo kaybı, fizik bakıda değişiklik olmadı, hiçbir ölüm yaşanmadı.

Üç Günlük Deney Sonuçları

Üç Günlük Grubun Biyokimyasal Değerleri ve Karşılaştırmalar

Sıçanların ilaç verilmesi öncesi ve ilaç verilmesinin üçüncü günü vücut ağırlığı, idrar miktarı, 24 saatlik idrarda protein, kreatinin, kalsiyum ve fosfor değerleriyle protein/kreatinin oranları Tablo VII' de gösterilmiştir.

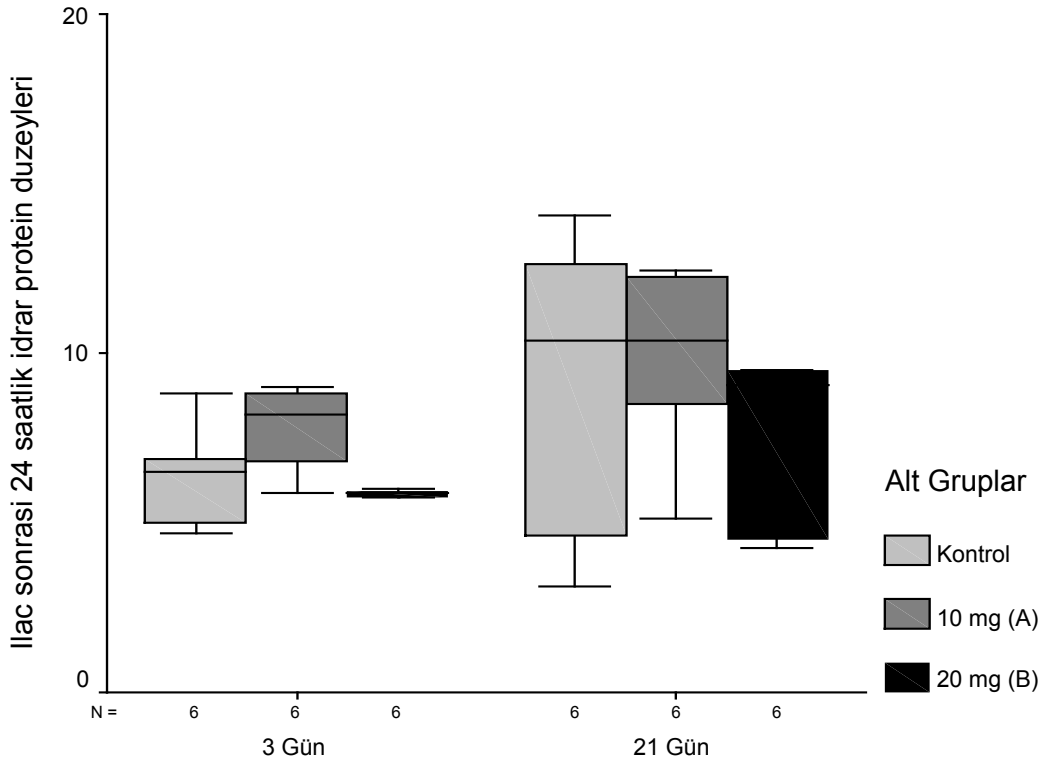
Alt gruplar arasında ilaç öncesi değerler açısından anlamlı bir farklılık yoktu. Ancak ilaç sonrası değerlerde her 3 grup arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=0,038$). İkili alt grup analizlerinde A ve B alt grupları arasında sadece idrar protein düzeyleri anlamlı farklılık göstermekteydi (Şekil 3). Üçüncü gün idrar protein düzeyi A grubunda B grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,015$). Ancak K grubunun; hem A hem de B alt gruplarıyla yapılan ikili karşılaştırmalarında biyokimyasal parametreler açısından herhangi anlamlı bir farklılığa rastlanmadı. Çalışılan diğer tüm parametrelerde alt gruplar arasında üçüncü gün değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Alt gruplarda ilaç uygulama öncesi ve sonrası değerleri grup içi olarak karşılaştırıldığında; K grubunda hiçbir parametrede anlamlı bir farklılık saptanmadı. A grubunda sıfırıncı gün ve üçüncü gün günlük protein atılımları (sırasıyla 5,9 mg/gün; 8,2 mg/gün, $p=0,028$), günlük kreatinin atılımları (sırasıyla 6,46 mg/gün; 2,71 mg/gün, $p=0,028$) ve idrar protein/kreatinin oranları (sırasıyla 0,9 mg/gün, 2,5 mg/gün, $p=0,028$) arasında anlamlı farklılık saptandı (Şekil 4). Günlük idrar miktarı ilaç uygulaması sonrasında azalmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla 11,5 ml/gün; 11,0 ml/gün, $p=0,056$). B grubunda ise ilaç öncesi ve sonrası değerlerde sadece idrar protein değerleri arasında istatistiksel olarak sınırda anlamlı bir farklılık saptandı. Bu alt grupta ilaç sonrası idrar protein düzeyi anlamlı düzeyde daha düşük (sırasıyla 6,37 mg/gün; 5,86 mg/gün, $p=0,046$) bulundu. Günlük idrar miktarında ilaç uygulanması sonrası belirgin bir azalma gözlenmesine karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla 12 cc/gün; 8,5 cc/gün, $p=0,08$). B grubunda diğer parametrelerde herhangi anlamlı bir farklılık saptanmadı.

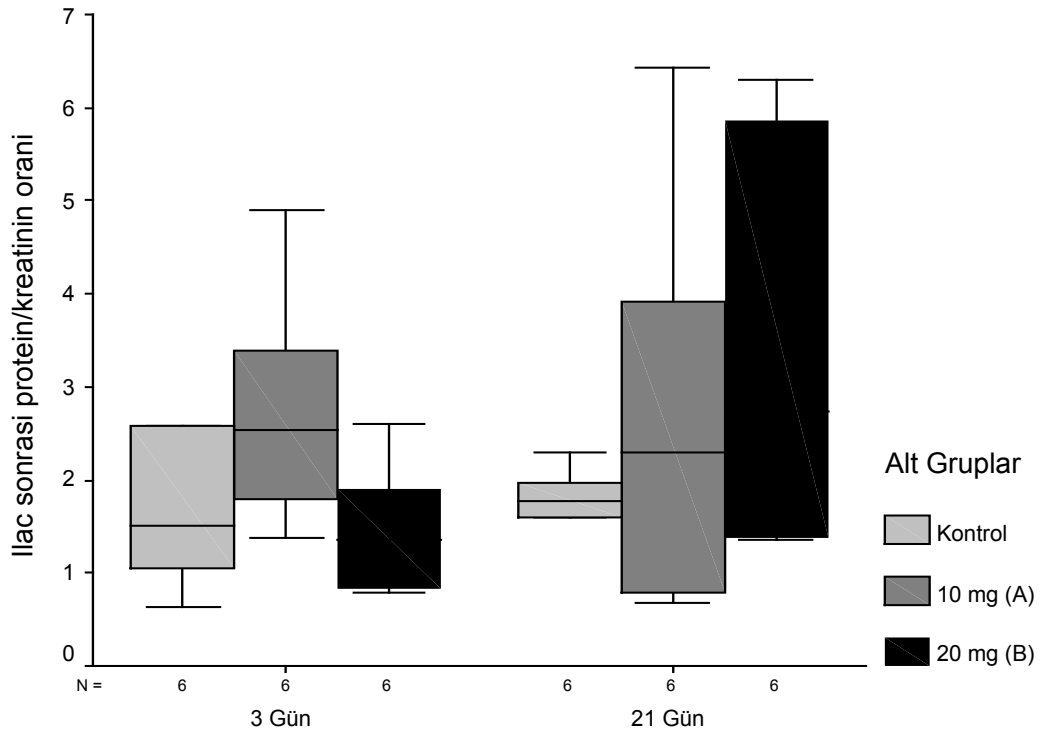
Tablo VII: Tüm Grupların Biyokimyasal Verileri ve Protein/Kreatinin Oranları

	3 günlük sonuçlar (median (min.-maks.))						21 günlük sonuçlar	
	0. gün			3. gün			0. gün	
	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)	Kontrol (K)	10 mg (A)
VA	220 (184-255)	212 (180-268)	200 (184-245)	215 (188-254)	212 (185-258)	199 (178-240)	220 (203-233)	228 (207-261)
İM	13,0 (10,0-24,0)	11,5 (11,0-14,0)	12,0 (9,0-14,0)	11,50 (7,0-19,0)	11,00 (9,0-12,0)	8,50 (4,0-15,0)	8,50 (4-10)	10,0 (2-14)
İP	5,73 (4,9-8,1)	5,91 (5,2-6,8)	6,37 (5,7-6,7)	6,47 (4,7-8,8)	8,19 (5,9-9,0)	5,86 (4,8-6,0)	10,23 (7,6-14,2)	11,45 (2,9-15,7)
İK	7,28 (5,1-9,7)	6,46 (3,6-8,8)	5,79 (2,3-8,4)	4,16 (1,7-7,8)	2,71 (1,8-5,5)	4,77 (2,3-7,4)	3,60 (11,2-7,6)	2,34 (1,2-5,8)
İCa	2,25 (0,5-3,5)	3,40 (1,0-6,1)	2,04 (1,0-3,4)	0,80 (0,5-3,5)	0,86 (0,5-1,6)	1,54 (0,5-2,3)	0,49 (0,3-1,0)	0,62 (0,3-0,8)
İP	0,65 (0,5-1,2)	0,57 (0,6-0,7)	0,60 (0,5-0,7)	0,62 (0,4-1,0)	0,55 (0,5-0,6)	0,42 (0,2-0,8)	0,42 (0,2-0,5)	0,50 (0,2-0,7)
P/Kr	0,8 (0,6-1,1)	0,9 (0,7-1,5)	1,1 (0,8-2,7)	1,5 (0,6-5,1)	2,5 (1,4-4,9)	1,4 (0,8-2,6)	2,7 (1,9-10,2)	3,7 (1,4-13,4)

VA: Vücut ağırlığı (gr), İM: Günlük idrar miktarı (ml), İP: Günlük protein atılımı (mg/gün),
İK: Günlük Kreatinin (mg/gün), İCa: Günlük kalsiyum
atılımı (mg/gün), İP: Günlük fosfor atılımı (mg/gün), P/Kr: 24 Saatlik İdrarda
Protein/Kreatinin Oranı



Şekil 3: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası günlük protein atılımları



Şekil 4: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası protein/kreatinin oranları

Üç Günlük Grubun Genel Patolojik Değerlendirmeleri

K, A ve B alt gruplarının patolojik değerlendirilmesinde hiçbir doku örneğinde glomerüloskleroz bulgusuna rastlanılmadı.

Glomerülde fokal nekroz (GFN) derecesi alt gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiyordu (Tablo VIII).

Tablo VIII: Üç Günlük Grupta Glomerülde Fokal Nekroz Derecesi

GFN	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	1 (17)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	4 (66)	3 (50)	3 (50)
++ (%)	1 (17)	3 (50)	2 (33)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	1 (17)

İlaç dozajı arttıkça Bowman kapsül aralığında genişleme (BKAG) derecesinin kontrol grubuna göre ilaç kullananlarda arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p=0,034) (Tablo IX).

Tablo IX: Üç Günlük Grupta Bowman Kapsül Aralığında Genişleme Derecesi

BKAG	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	2 (33)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	4 (67)	1 (17)	3 (50)
++ (%)	0 (0)	5 (83)	3 (50)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tübül epitelinde dejenerasyon (TED), tübül epitelinde nekroz (TEN) ve tübül dilatasyonu (TD) hiçbir grupta belirgin şekilde oluşmamıştı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu (Tablo X, XI ve XII).

Tablo X: Üç Günlük Grupta Tübül Epitelinde Dejenerasyon Derecesi

TED	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	5 (83)	5 (83)	6 (100)
++ (%)	1 (17)	1 (17)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XI: Üç Günlük Grupta Tübül Epitelinde Nekroz Derecesi

TEN	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	5 (83)	5 (83)	5 (83)
+ (%)	1 (17)	1 (17)	1 (17)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XII: Üç Günlük Grupta Tübül Dilatasyon Derecesi

TD	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	2 (33)	0 (0)	2 (33)
+ (%)	4 (67)	5 (83)	4 (67)
++ (%)	0 (0)	1 (17)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

İnterstisyel inflamasyonun (İİ) özellikle 20 mg ilaç verilen grupta belirginleştiği ve alt gruplar arasında 10 mg grubuna göre anlamlı olarak yüksek oranda saptandığı saptandı (p=0,03) (Tablo XIII).

Tablo XIII: Üç Günlük Grupta İnterstisyel İnflamasyon Derecesi

İİ	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	3 (50)	4 (67)	0 (0)
+ (%)	3 (50)	2 (33)	4 (67)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	2 (33)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Konjesyon ve damar duvarında kalınlaşma (DDK) tüm gruplarda hafif düzeyde oluşmuştu ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo XIV ve XV).

Tablo XIV: Üç Günlük Grupta Konjesyon Derecesi

Konjesyon	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	5 (83)	6 (100)	4 (67)
++ (%)	1 (17)	0 (0)	2 (33)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XV: Üç Günlük Grupta Damar Duvarında Kalınlaşma Derecesi

DDK	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	4 (67)	5 (83)	3 (50)
+ (%)	2 (33)	1 (17)	3 (50)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Hiçbir alt grubun doku örneğinde interstisyel fibrozis bulgusuna rastlanmadı.

21 Günlük Deney Sonuçları

Yirmibir Günlük Grubun Biyokimyasal Değerleri ve Karşılaştırmalar

Sıçanların ilaç öncesi ve ilaç sonrası 21. gün vücut ağırlığı, idrar miktarı, 24 saatlik idrarda protein, kreatinin, kalsiyum ve fosfor değerleriyle protein/kreatinin oranları Tablo VII' de gösterilmiştir.

Alt gruplar arasında, biyokimyasal parametreler ve protein/kreatinin oranları açısından; hem ilaç öncesi hem de ilaç sonrası değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Alt gruplarda ilaç öncesi ve sonrası değerleri grup içi olarak karşılaştırıldığında; K grubunda sadece vücut ağırlığında ilaç sonrası anlamlı bir artış oldu (sırasıyla 220 gr; 226 gr, $p=0,039$). On mg (A) grubunda ilaç öncesi ve sonrası laboratuvar incelemelerinin hiçbirinde anlamlı farklılık saptanmadı. Ancak protein/kreatinin oranı ilaç sonrası daha düşük olarak bulundu (Şekil 4). Bu fark istatistiksel olarak sınırda anlamlıydı ($p=0,046$). Yirmi mg (B) grubunda ise ilaç öncesi ve sonrası değerler arasında hiçbir biyokimya parametresi ve protein/kreatinin oranı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Yirmibir Günlük Grubun Genel Patolojik Değerlendirmeleri

K, A ve B alt gruplarının patolojik değerlendirilmesinde hiçbir doku örneğinde glomerüloskleroz bulgusuna rastlanmadı.

Glomerülde fokal nekroz ve Bowman kapsül aralığında genişleme dereceleri alt gruplar arasında anlamlı farklılık göstermiyordu (Tablo XVI ve XVII).

Tübül Epitelinde Dejenerasyon (TED) derecesi ilaç verilen sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla daha anlamlı olarak yüksek olarak gözlendi ($p=0,038$) (Tablo XVIII).

Tablo XVI: 21 Günlük Grupta Glomerülde Fokal Nekroz Derecesi

GFN	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	6 (100)	5 (83)	5 (83)
++ (%)	0 (0)	1 (17)	1 (17)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XVII: 21 Günlük Grupta Bowman Kapsül Aralığında Genişleme Derecesi

BKAG	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	4 (67)	5 (83)	4 (67)
++ (%)	2 (33)	1 (17)	2 (33)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tübül epitelinde nekroz (TEN) kontrol grubundaki 6 sıçandan yalnızca birinde hafif şiddette gözlenirken, ilaç verilen gruplardaki sıçanların hepsinde gelişmişti (Tablo XIX). İlaç alan ve almayan sıçanlar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,001).

Tablo XVIII: 21 Günlük Grupta Tübül Epitelinde Dejenerasyon Derecesi

TED	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	6 (100)	2 (33)	3 (50)
++ (%)	0 (0)	4 (67)	3 (50)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XIX: 21 Günlük Grupta Tübül Epitelinde Nekroz Derecesi

TEN	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	5 (83)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	1 (17)	6 (100)	5 (83)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	1 (17)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tübül dilatasyonu (TD), interstisyel inflamasyon (İİ) ve konjesyon tüm alt gruplarda hafif şiddette gözlemlendi. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo XX, XXI, XXII).

Tablo XX: 21 Günlük Grupta Tübül Dilatasyon Derecesi

TD	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	6 (100)	5 (83)	6 (100)
++ (%)	0 (0)	1 (17)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablo XXI: 21 Günlük Grupta İnterstisyel İnflamasyon Derecesi

İİ	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	1 (17)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	1 (17)	2 (33)	3 (50)
++ (%)	4 (67)	4 (67)	2 (33)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	1 (17)

Tablo XXII: 21 Günlük Grupta Konjesyon Derecesi

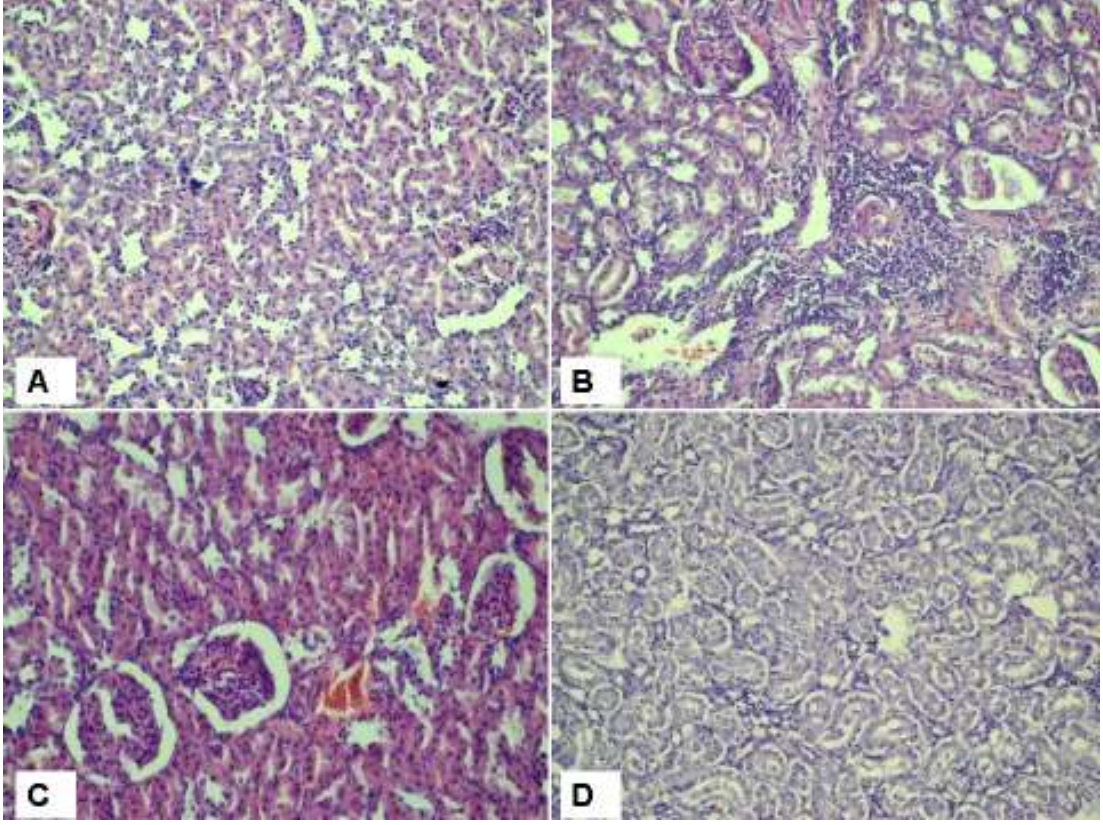
Konjesyon	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

İlaç verilen sıçanların hepsinde patolojik değerlendirmede damar duvarında kalınlaşma saptandı. İlaç alanlarda kalınlaşma anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,025$) (Tablo XXIII). Damar duvarında kalınlaşma yüksek doz grubunda daha belirgin olmasına karşın düşük doz grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,182$).

Tablo XXIII: 21 Günlük Grupta Damar Duvarında Kalınlaşma Derecesi

DDK	Kontrol (K)	10 mg (A)	20 mg (B)
- (%)	3 (50)	0 (0)	0 (0)
+ (%)	3 (50)	6 (100)	3 (50)
++ (%)	0 (0)	0 (0)	3 (50)
+++ (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

İnterstisyel fibrozis hiçbir grubun doku örneğinde gözlenmedi.



Resim 1: Üç Gün 10 mg/kg bevasizumab alan grupta patolojik değerlendirme: Olağan sınırlarda böbrek dokusu (A-kontrol grubu), interstisyel inflamasyon ve damar duvarında kalınlaşma (B), bowman kapsül aralığında genişleme (C), ve tübül epitelinde dejenerasyon ve nekroz bulguları (D) (Hematoksilen- Eozin, x200).

TARTIŞMA

Anjiogenezin tüm solid tümörlerin büyüme, invazyon ve metastaz aşamalarında kilit role sahip olduğunun gösterilmesi, antianjiyogenik yaklaşımların giderek artan bir hızla geliştirilmesine ve günümüz tedavi protokollerinde yer almasına yol açmıştır. Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve antianjiyogenik tedavide üzerinde en çok durulanı VEGF'dir. Faz I çalışmalarda rekombinant insan anti-VEGF-A monoklonal antikoru olan bevasizumabın kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiğinin bulunması, klinik çalışmaların bu ajan üzerine yoğunlaşmasına yol açmıştır. Günümüzde metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve metastatik meme kanseri tedavi protokollerinde halen kullanılmakta olan bevasizumabın en belirgin yan etkileri; hipertansiyon, proteinüri, kanama ve tromboza eğilimdir. Hedefe yönelik ajanların tedavi planlarında sıklıkla yer almasıyla birlikte yan etkileri de giderek artan sıklıkta araştırma konusu olmaktadır. Ancak konvansiyonel tedavilere göre henüz gelişim aşamasında olan bu tür tedavilerde rastlanan özel yan etkiler, oluşum mekanizmaları ve engelleyici tedavilere yönelik bilgiler oldukça yetersizdir. Benzer şekilde bevasizumab kullanımı sırasında rastlanan böbrek yan etkilerinin hangi mekanizmayla ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir. Bu konuyla ilgili çalışmalar oldukça az sayıdadır.

Bizim çalışmamızda üç günlük grupta 10 mg/kg dozunda bevasizumab uygulanan sıçanlarda günlük protein atılımı ile protein/kreatinin oranında anlamlı bir artış saptandı. Protein/kreatinin oranının nefrotik düzeylere kadar çıktığı gözlemlendi. Yirmi mg/kg doz grubunda (B) ise böyle bir artışa rastlanmadı. Ancak bu grupta günlük idrar miktarının diğer alt gruplara oranla daha belirgin olarak azaldığı ve protein/kreatinin oranının 10 mg/kg doz (A) grubu kadar olmasa da arttığı saptandı. Bu bulgular üç gün grubunda ilaç uygulanması sonrası A grubunda daha belirgin olmak üzere her iki alt grupta da (A ve B) böbrek hasarı oluştuğunu göstermektedir. Ancak B grubunda etkilenmenin, iki kat yüksek doz uygulanmasına rağmen A grubu kadar belirgin olmaması bevasizumabın farklı dozlarda böbrek üzerine farklı etkileri olabileceğini veya etkinin doz bağımlı olmayabileceğini düşündürmektedir. Ancak insanlardaki klinik çalışma sonuçları, yüksek doz grubu hastalarda proteinüri gelişim riskinin düşük doz grubuna göre biraz daha fazla olduğunu göstermektedir.

Yirmibir gün grubunda ise bakılan hiçbir biyokimyasal parametrede hem gruplar arası hem de alt grupların ilaç öncesi ve sonrası kendi içinde karşılaştırmalarında anlamlı bir farklılığa rastlanılmamıştır. Sugimoto ve arkadaşları (40) tarafından bu konuyla ilgili yapılmış ilk çalışmada farelere anti-fare VEGF monoklonal antikoru veya sFlt-1 verilmesini takiben üçüncü saatten

başlayarak belirgin proteinürinin geliştiği gösterilmiştir. Proteinüri düzeyleri anti-VEGF ile beraber VEGF verildiğinde kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Farelerdeki patolojik bulguların 24 saatten sonra azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle 21 günlük bir bekleme süresinde; mevcut bir etkilenmenin, ara dönemde en azından biyokimyasal parametreler açısından ortadan kalktığını veya uygulanan ilaca karşı süre uzunluğu nedeniyle bir immünizasyonun gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular ile bevasizumab ile yapılacak bir deneysel model için 21 günlük bir sürenin uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

VEGF baskılanmasının glomerül ve tübül yapıları üzerine olan etkileriyle ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu konuyla ilgili klinik veriler ise sadece olgu sunumları şeklinde bildirilmiştir. Sugimoto ve arkadaşları proteinüri düzeyleri ölçümünün yanı sıra, fare böbreklerinde elektron mikroskopik incelemeler de yapmışlardır. İlaç uygulamasından itibaren 5. saatten başlayarak; endotelyal hücre hipertrofisi ve hasarı ile glomerül bazal membranından endotel ayrışması geliştiğini bildirmişlerdir. Elektron mikroskopik olarak saptanan podosit yapı hasarı, Western Blot analizinde podosit ilişkili bir protein olan nefrinin azalmış bulunmasıyla da desteklenmiştir. Yeni yayınlanan 6 hastalık bir vaka serisinde Eremina ve arkadaşları (86) bevasizumabla tedavi edilen ve proteinüri veya böbrek yetmezliği gelişen kanser hastalarının hepsinde, mikroskopik ve elektron mikroskopik olarak, başlıca patolojinin trombotik mikroanjyopatiyle karakterize glomerüler hasarlanma olduğunu saptamışlardır.

Bizim çalışmamızda üç günlük grupta en belirgin patolojik bulgu A grubunda daha belirgin olmak üzere, bowman kapsül aralığında genişlemeydi. Bu genişleme A grubunda kontrol grubuna göre daha belirgin bulunurken, B grubundaki farklılık ise istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Bowman kapsül aralığında genişleme glomerüllerde hasarlanmayı gösterebilen non-spesifik erken bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Ancak glomerül yapısındaki yapısal bir bozulmanın tam doğrulukla saptanabilmesi için elektron mikroskopik bakıya da ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızda histolojik değerlendirmeler sadece direkt mikroskopik bakıyla yapılabildi. Ancak bulgularımız; biyokimyasal parametrelerle birlikte değerlendirildiğinde başlıca patolojinin, en azından erken dönemde, glomerüler hasar olduğunu düşündürmektedir. Yirmi bir gün grubunda ise, alt gruplar arasında bowman kapsül aralığında genişleme açısından bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Bu grupta biyokimyasal analizlerde olduğu gibi yapısal anlamda benzer bir düzelme söz konusu olabilir.

Çalışmamızdaki bir diğer belirgin bulgu üç günlük grupta gözlenen interstisyel inflamasyon ve 21 gün grubunda belirginleşen tübül epitelinde dejenerasyon ve tübül epitelinde nekroz ile damar duvarlarında kalınlaşmadır. Üçüncü günden itibaren gözlenen interstisyel inflamasyon ileri dönemde tübül epitel dejenerasyon ve nekrozuna neden olmuş olabilir. Erken dönemde meydana gelen ve ışık mikroskopisi düzeyinde net olarak saptanamayan glomerül hasarı sonrası, ileri dönemde tübülointerstisyel hasarlanma meydana gelmiş olabilir. Tüm bu patolojik

bulgularımıza dayanarak erken dönemde meydana gelen bir glomerül hasarına karşı koruyucu bir etki gelişmiş olabilece ancak tablonun ileri dönemlerde bir tübülointerstisyel nefrit durumuna dönüşebileceği düşünülebilir. Eldeki literatür bilgileri ışığında normal sıçanlarda bevasizumab veya anti-VEGF kullanımına bağlı bir tübülointerstisyel nefrit durumu bildirilmemiştir. Ancak progresif kresentrik glomerülofritli farelerde, soluble VEGFR-1 (sFlt-1) overekspresyonu yoluyla VEGF blokajının renal hasarı hızlandırdığı (87), ayrıca VEGF-A spesifik bir aptamer ile glomerüler kapillerlerin tamirinin önlenmesinin hızlı ve masif bir tübülointerstisyel fibrozis gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (44). Bizim çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak uzun döneme sahip bir grup da bulunmaktadır. Literatürdeki bu konuyla ilgili çalışmalar genellikle birkaç saat ve gün arasında yapılmış olup sıçanlarda bevasizumab kullanımıyla ilgili böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz damar duvarında kalınlaşma bulgusu bevasizumab'ın bir diğer yan etkisi olan tromboza eğilimi akla getirmektedir. Ancak çalışmamızda trombotik bir süreçte görmeyi beklediğimiz terminal arteriyol ve kapillerlerde trombüs ile buna sekonder iskemik bulgular saptanamamıştır.

Çalışmaya başlarken amacımız, insan VEGF monoklonal antikoru bevasizumab kullanarak, bu tedavinin böbrek üzerine olan yan etkilerini gözlemleyebileceğimiz deneysel bir sıçan modeli oluşturmaktır. Böylesi bir model; bevasizumab tedavisinin böbrek üzerine olan etkilerin saptanması ve bu etkilerin kemoterapinin etkinliğini bozmadan önlenmesine yönelik çalışmalara yardımcı olacaktır. Çalışmamız böyle bir sıçan modelinin oluşturulmasında 10 mg/kg dozunda üç günlük bevasizumab uygulanmasının daha uygun olduğunu düşündürmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan VEGF monoklonal antikoru olan bevasizumabın böbrek üzerine olan yan etkilerini gözlemleyebileceğimiz deneysel bir sıçan modeli oluşturmak için 10 mg/kg dozunda üç günlük bevasizumab uygulanmasının uygun olduğu görülmüştür. İnsan anti-VEGF ile sıçanlarda böyle bir modelin oluşturulması, bu tedavi altındaki hastalarda böbreği koruyucu ajanlara yönelik yapılacak çalışmalar için bir temel olacaktır. Benzer bir çalışmada bevasizumabın sıçan VEGF reseptörlerine bağlanma özelliklerinin belirlenmesi ve elektron mikroskopik değerlendirme daha kesin sonuçlar verebilir.

KAYNAKLAR

1. Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, Heim W, Berlin J, Holmgren E, Hambleton J, Novotny WF, Kabbinavar F. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer [J Clin Oncol](#). 2005; 23:3502-8.
2. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer [N Engl J Med](#). 2004;350:2335-42.
3. Giantonio BJ, Levy DE, O'dwyer PJ, Meropol NJ, Catalano PJ, Benson AB 3rd; Eastern Cooperative Oncology Group. A phase II study of high-dose bevacizumab in combination with irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin, as initial therapy for advanced colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group study E2200. [Ann Oncol](#). 2006;17:1399-403.
4. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB 3rd; Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. [J Clin Oncol](#). 2007;25:1539-44.
5. Ramalingam SS, Dahlberg SE, Langer CJ, Gray R, Belani CP, Brahmer JR, Sandler AB, Schiller JH, Johnson DH; Eastern Cooperative Oncology Group. Outcomes for elderly, advanced-stage non small-cell lung cancer patients treated with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel: analysis of Eastern Cooperative Oncology Group Trial 4599. [J Clin Oncol](#). 2008;26:60-5.
6. Cabebe E, Wakelee H. Role of anti-angiogenesis agents in treating NSCLC: focus on bevacizumab and VEGFR tyrosine kinase inhibitors. [Curr Treat Options Oncol](#). 2007;8:15-27.
7. Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. [Clin Cancer Res](#). 2004;10:4258-4262.
8. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus

- capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. [J Clin Oncol](#). 2005;23:792-9.
9. Schneider BP, Wang M, Radovich M, Sledge GW, Badve S, Thor A, Flockhart DA, Hancock B, Davidson N, Gralow J, Dickler M, Perez EA, Cobleigh M, Shenkier T, Edgerton S, Miller KD; ECOG 2100. Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. [J Clin Oncol](#). 2008;26:4672-8.
 10. Dellapasqua S, Bertolini F, Bagnardi V, Campagnoli E, Scarano E, Torrioni R, Shaked Y, Mancuso P, Goldhirsch A, Rocca A, Pietri E, Colleoni M. Metronomic Cyclophosphamide and Capecitabine Combined With Bevacizumab in Advanced Breast Cancer. [J Clin Oncol](#). 2008;26:4899-905.
 11. de Gramont A, Van Cutsem E. Investigating the potential of bevacizumab in other indications: metastatic renal cell, non-small cell lung, pancreatic and breast cancer. [Oncology](#). 2005;69:46-56.
 12. Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. [Am J Kidney Dis](#). 2007;49:186-93.
 13. Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. [Blood](#). 2000 Apr 1;95:2304-11.
 14. Olgar Ş, Yetgin S. Anjiogenezis. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003; 46:139-147.
 15. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971; 285:1182-6.
 16. Güllü İ, XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi
 17. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. [Semin Oncol](#). 2002;29:10-4.
 18. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. [Nat Rev Cancer](#). 2002; 2:795-803.
 19. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. [J Cell Biochem](#). 1991;47:211-8.

20. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. [J Biol Chem](#). 1991;266:11947-54.
21. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. [Endocr Rev](#). 1992;13:18-32.
22. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. [J Exp Med](#). 2002;196:1497-506.
23. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. [Nat Med](#). 2002;8:841-9.
24. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. [Nat Med](#). 2001;7:192-8.
25. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. [Nat Med](#). 2001;7:186-91.
26. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. [Am J Pathol](#). 1995;146:1029-39.
27. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. [Lancet Oncol](#). 2001;2:149-56.
28. Van Buren G 2nd, Camp ER, Yang AD, Gray MJ, Fan F, Somcio R, Ellis LM. The role of nitric oxide in mediating tumour blood flow. [Expert Opin Ther Targets](#). 2006;10:689-701.
29. Longo R, Sarmiento R, Fanelli M, Capaccetti B, Gattuso D, Gasparini G. Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies. [Angiogenesis](#). 2002;5:237-56.
30. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. [J Anat](#). 2002;200:581-97.

31. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. [Endocr Rev.](#) 1997;18:4-25.
32. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. [Recent Prog Horm Res.](#) 2000;55:15-35.
33. Abrahamson DR. Glomerular endothelial cell development. [Kidney Int.](#) 1999;56:1597-8.
34. Robert B, Zhao X, Abrahamson DR. Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF(164) in developing and mature mouse kidney glomeruli. [Am J Physiol Renal Physiol.](#) 2000;279:275-82.
35. Honkanen EO, Teppo AM, Grönhagen-Riska C. Decreased urinary excretion of vascular endothelial growth factor in idiopathic membranous glomerulonephritis. [Kidney Int.](#) 2000;57:2343-9.
36. Kang DH, Joly AH, Oh SW, Hugo C, Kerjaschki D, Gordon KL, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Madsen KM, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. [J Am Soc Nephrol.](#) 2001;12:1434-47.
37. Kang DH, Johnson RJ. Vascular endothelial growth factor: a new player in the pathogenesis of renal fibrosis. [Curr Opin Nephrol Hypertens.](#) 2003;12:43-9.
38. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. [J Am Soc Nephrol.](#) 2001;12:1448-57.
39. Suga S, Kim YG, Joly A, Puchacz E, Kang DH, Jefferson JA, Abraham JA, Hughes J, Johnson RJ, Schreiner GF. Vascular endothelial growth factor (VEGF121) protects rats from renal infarction in thrombotic microangiopathy. [Kidney Int.](#) 2001;60:1297-308.
40. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. [J Biol Chem.](#) 2003;278:12605-8.
41. Miner JH. Focusing on the glomerular slit diaphragm: podocin enters the picture. [Am J Pathol.](#) 2002;160:3-5.

42. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. [J Clin Invest.](#) 2003;111:649-58.
43. Hara A, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S. Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. [Kidney Int.](#) 2006;69:1986-95.
44. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. [J Clin Invest.](#) 1999;104:913-23.
45. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, Tilton RG, Rasch R, Lameire NH, De Vriese AS. Pathophysiological role of vascular endothelial growth factor in the remnant kidney. [Nephron Exp Nephrol.](#) 2005;101:9-15.
46. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. [J Am Soc Nephrol.](#) 2001;12:993-1000.
47. Schrijvers BF, Rasch R, Tilton RG, Flyvbjerg A. High protein-induced glomerular hypertrophy is vascular endothelial growth factor-dependent. [Kidney Int.](#) 2002;61:1600-4.
48. Flyvbjerg A, Dagnaes-Hansen F, De Vriese AS, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. [Diabetes.](#) 2002;51:3090-4.
49. Miyamoto K, Kitamoto Y, Tokunaga H, Takeya M, Ezaki T, Imamura T, Tomita K. Protective effect of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor 165 and 121 on glomerular endothelial cell injury in the rat. [Lab Invest.](#) 2004;84:1126-36.
50. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. [Nature.](#) 1996;380:435-9.

51. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. [Nature](#). 1996;380:439-42.
52. Kitamoto Y, Tokunaga H, Tomita K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. [J Clin Invest](#). 1997;99:2351-7.
53. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. [Development](#). 1999;126:1149-59.
54. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. [J Clin Invest](#). 2003;111:707-16.
55. Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, Ema M, Rossant J, Jothy S, Miner JH, Quaggin SE. Vascular endothelial growth factor signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. [J Am Soc Nephrol](#). 2006;17:724-35.
56. Kitamoto Y, Matsuo K, Tomita K. Different response of urinary excretion of VEGF in patients with chronic and acute renal failure. [Kidney Int](#). 2001;59:385-6.
57. Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, Gordon KL, Oyama TT, Hughes J, Hugo C, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. [Am J Kidney Dis](#). 2001;37:601-11.
58. Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. [J Biol Chem](#). 2005;280:9904-12.
59. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. [J Cardiovasc Pharmacol](#). 1996;27:838-44.
60. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. [Ann Surg](#). 2003;238:9-28.

61. Jung YD, Mansfield PF, Akagi M, Takeda A, Liu W, Bucana CD, Hicklin DJ, Ellis LM. Effects of combination anti-vascular endothelial growth factor receptor and anti-epidermal growth factor receptor therapies on the growth of gastric cancer in a nude mouse model. [Eur J Cancer](#). 2002;38:1133-40.
62. Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. [Cancer Res](#). 1999;59:99-106.
63. Kuenen BC, Rosen L, Smit EF, Parson MR, Levi M, Ruijter R, Huisman H, Kedde MA, Noordhuis P, van der Vijgh WJ, Peters GJ, Cropp GF, Scigalla P, Hoekman K, Pinedo HM, Giaccone G. Dose-finding and pharmacokinetic study of cisplatin, gemcitabine, and SU5416 in patients with solid tumors. [J Clin Oncol](#). 2002;20:1657-67.
64. Herbst RS, Hidalgo M, Pierson AS, Holden SN, Bergen M, Eckhardt SG. Angiogenesis inhibitors in clinical development for lung cancer. [Semin Oncol](#). 2002;29:66-77.
65. Patyna S, Arrigoni C, Terron A, Kim TW, Heward JK, Vonderfecht SL, Denlinger R, Turnquist SE, Evering W. Nonclinical Safety Evaluation of Sunitinib: A Potent Inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3, and RET Receptors. [Toxicol Pathol](#). 2008;3.
66. Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, Wood J, Gruber G, Pruschy M, Djonov V. Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. [Am J Pathol](#). 2008;173:1173-85.
67. Ren W, Korchin B, Lahat G, Wei C, Bolshakov S, Nguyen T, Merritt W, Dicker A, Lazar A, Sood A, Pollock RE, Lev D. Combined vascular endothelial growth factor receptor/epidermal growth factor receptor blockade with chemotherapy for treatment of local, uterine, and metastatic soft tissue sarcoma. [Clin Cancer Res](#). 2008;14:5466-75.
68. Beebe JS, Jani JP, Knauth E, Goodwin P, Higdon C, Rossi AM, Emerson E, Finkelstein M, Floyd E, Harriman S, Atherton J, Hillerman S, Soderstrom C, Kou K, Gant T, Noe MC, Foster B, Rastinejad F, Marx MA, Schaeffer T, Whalen PM, Roberts WG. Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular

- endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy. [Cancer Res.](#) 2003;63:7301-9.
69. Cohen RB, Langer CJ, Simon GR, Eisenberg PD, Hainsworth JD, Madajewicz S, Cosgriff TM, Pierce K, Xu H, Liao K, Healey D. A phase I/randomized phase II, non-comparative, multicenter, open label trial of CP-547,632 in combination with paclitaxel and carboplatin or paclitaxel and carboplatin alone as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). [Cancer Chemother Pharmacol.](#) 2007;60:81-9.
70. Aita M, Fasola G, Defferrari C, Brianti A, Bello MG, Follador A, Sinaccio G, Pronzato P, Grossi F. Targeting the VEGF pathway: Antiangiogenic strategies in the treatment of non-small cell lung cancer. [Crit Rev Oncol Hematol.](#) 2008;68(3):183-96
71. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. [N Engl J Med.](#) 2006;355:2542-50.
72. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. [Clin Ther.](#) 2006;28:1779-802.
73. Sandler A. Bevacizumab in non small cell lung cancer. [Clin Cancer Res.](#) 2007;13:4613-6.
74. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. [N Engl J Med.](#) 2004;350:2335-42.
75. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, Cobleigh MA, Marcom PK, Fehrenbacher L, Dickler M, Overmoyer BA, Reimann JD, Sing AP, Langmuir V, Rugo HS. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. [J Clin Oncol.](#) 2005;23:792-9.
76. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. [N Engl J Med.](#) 2003;349:427-34.
77. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F.

- Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. [J Clin Oncol](#). 2004;22:2184-91.
78. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. [J Clin Oncol](#). 2003;21:60-5.
 79. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, Patel T, Hamm JT, Hecht JR, Mass R, Perrou B, Nelson B, Novotny WF. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. [J Clin Oncol](#). 2005;23:3697-705.
 80. Kindler HL, Karrison T, Gandara DR, et al: A multicenter, double-blind, placebo-controlled randomized phase II trial of gemcitabine/cisplatin (GC) plus bevacizumab (B) or placebo in patients with malignant mesothelioma (MM). Presented at the 41st Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Orlando, FL, May 13-17, 2005 (abstr 7019)
 81. Zhu X, Wu S, Dahut WL, Parikh CR. Risks of proteinuria and hypertension with bevacizumab, an antibody against vascular endothelial growth factor: systematic review and meta-analysis. [Am J Kidney Dis](#). 2007;49:186-93.
 82. Dincer M, Altundag K. Angiotensin-converting enzyme inhibitors for bevacizumab-induced hypertension. [Ann Pharmacother](#). 2006;40:2278-9.
 83. Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. [Oncology](#). 2005;69:25-33.
 84. Paude AU, Lombardo JC, Fakih M, et al: Bevacizumab (BV) induced hypertension (HT): A manageable toxicity. J Clin Oncol 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I.2006;24:135-39.
 85. Siddiqui AJ, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, Grinnemo KH, Dellgren G, Hao X, Fischer H, Sylvén C. Antagonism of the renin-angiotensin system can counteract cardiac angiogenic vascular endothelial growth factor gene therapy and myocardial angiogenesis in the normal heart. [Am J Hypertens](#). 2005;18:1347-52.
 86. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, Richardson C, Kopp JB, Kabir MG, Backx PH, Gerber HP, Ferrara N, Barisoni L, Alpers CE, Quaggin SE. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* 2008;358:1129-36.

87. Hara A, Wada T, Furuichi K, Sakai N, Kawachi H, Shimizu F, Shibuya M, Matsushima K, Yokoyama H, Egashira K, Kaneko S. Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2006;69:1986-95.