

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

**SIÇAN ABDOMİNAL AORTA FİZYOLOJİK
YANITLARINA BEVASİZUMABIN ETKİLERİ**

Ayşegül GÜMÜŞ BAŞKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**

SIÇAN ABDOMİNAL AORTA FİZYOLOJİK YANITLARINA BEVASİZUMABIN ETKİLERİ

Ayşegül GÜMÜŞ BAŞKAYA

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 08 Şubat 2016


Tez Danışmanı : Doç. Dr. Canit NACİTARHAN
• Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


Üye : Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı


Üye : Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Mersin Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bevasizumab, insan vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörüne spesifik rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'nin reseptöre bağlanmasını inhibe ederek biyolojik aktivitesini nötralize eder. Böylelikle tümörün damarlanmasını dolayısıyla büyümesini yavaşlatır ve Bevasizumab ile tedavi edilen hastalarda %34'e kadar oranlarda hipertansiyon gözlenmektedir. Eldeki veriler hipertansiyonun esas kaynağı olarak damar endotel tabakasını işaret etmekte ise de bu konuda yapılmış kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada bevasizumabın arter fizyolojisi üzerine in vitro etkileri araştırılmıştır.

Sıçanlara 35 mg/kg bevasizumab intravenöz 21 günde 1 defa olmak üzere toplam 3 defa uygulanmıştır. 3. uygulamadan 7 gün sonra sıçanlar sakrifiye edildikten sonra, abdominal aorta çıkarılıp uygun bir şekilde organ banyosuna asılmıştır. Anjiyotensin II, noradrenalin ve endotelin-1 ile kümülatif ve 30 mM KCl ile tek konsantrasyonda kasılma yanıtları, fenilefrin ile ön kasılma oluşturulan preparatlarda asetilkolin veya sodyum nitroprusid ile gevşeme yanıtları ve L-arjinin, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indometazin ve L-NAME+indometazin ile inkübasyon sonrasında asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrileri son olarak indometazin+karibdotoksin+apamin ile inkübasyon sonrasında bevasizumab uygulanan ve uygulanmayan gruplarda asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir.

Çalışmada başlangıç ve 3. bevasizumab uygulama öncesinde ölçülen kan basınçları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kasılma yanıtlarında da kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmemiştir. Damar gevşeme yanıtlarında ise yalnızca Asetilkolin ile oluşturulan gevşeme yanıtlarının kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı ve L-arjinin inkübasyonu sonrasında damar gevşeme yanıtlarının arttığı gösterilmiştir. Çalışmanın sonuçları bevasizumabın damar kasılma yanıtlarından öte gevşeme yanıtlarını bozduğunu göstermektedir. İlacın tedavi sırasında oluşturduğu hipertansif yan etkiden endotel kaynaklı nitrik oksit üretimi/salınımının bozulmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bevasizumab, VEGF inhibitörleri, Hipertansiyon, Endotel fonksiyonu ve Nitrik oksit

ABSTRACT

Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal antibody which specifically binds to human vascular endothelial growth factor receptor. It inhibits the binding of vascular endothelial growth factor (VEGF) to its receptor and neutralize the vascularization of the tumor, thus slow the growth in cancer treatment. In cancer patients who had treated with bevacisumab, hypertension had been observed in amount of %34 patients. Available data suggest that the vascular endothelium as the main source of hypertension, there is no comprehensive study on this subject. This study investigated the in vitro effects of bevacizumab in the artery physiology.

Bevacizumab was administered doses of 35 mg/kg to Wistar rats intravenously once every 21 days a total of 3 times. 7 days after the last application the rats were sacrificed, the abdominal aorta was removed and was hanged on the organ bath properly. Angiotensin II, norepinephrine and endothelin-1 with cumulatively concentrations and 30 mM KCl with a single concentration contractile responses, phenylephrine in front contractions generated preparations acetylcholine or sodium nitroprusside relaxant responses and L-arginine, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), indomethacin acetylcholine concentration-response curves after incubation with L-NAME+indomethacin finally after incubation with indomethacin+charybdotoxin+apamin, bevacizumab were administered and were not administered to group, were obtained acetylcholine concentration response curves.

There was no significant difference in blood pressure measured at the beginning and after 3 prior bevacizumab administration were observed in this study. Contraction responses were not found a significant differences compared to the control group. After the incubation of L-arginine, the response of vascular relaxation was increased and vascular relaxation had been observed statistically significant only induced by acetylcholine compared to control. Our results indicate that bevacizumab beyond vasoconstriction response impairs the response of relaxation. Our results suggest that hypertensive side effects during the treatment of drug are occurred from the deterioration of the endothelium-derived NO generated / releasement.

Keywords: Bevacizumab, VEGF inhibitors, Hypertension, Endothelial physiology and Nitric oxide

TEŞEKKÜRLER

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Doç. Dr. Cahit NACİTARHAN'a , değerli bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Sadi ÖZDEM olmak üzere diğer öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Coşkun USTA'ya, Prof. Dr. Arda TAŞATARGİL'e, Prof. Dr. Nuray ERİN'e, Doç. Dr. Selvinaz TAŞATARGİL'e, Doç. Dr. Edibe MİNARECİ'ye, Yard. Doç. Dr. Gül ÖZBEY'e, Yard. Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA'ya, sağlık bilimleri enstitüsü personellerine, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, bugüne kadar beni her konuda destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ÖZDOĞAN'a, her durumda ve koşulda yanımda olan sevgili eşim Mehmet Çetin BAŞKAYA'ya ve canım anneme, babama, ablama içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay Sayfası	iii
Özet	iv
Abstract	v
Teşekkürler	vi
İçindekiler	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Şekiller Dizini	x
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Anjiyogenez	2
2.2. Endotel Yapısı ve Fonksiyonları	4
2.2.1. Endotel Yapısı	4
2.2.2. Endotel Fizyolojik Özellikleri	5
2.2.2.1. Nitrik Oksit	8
2.2.2.2. Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktörler	11
2.2.2.3. Prostatiklin	12
2.2.2.4. Adenozin	13
2.2.2.5. Bradikinin	14
2.2.2.6. Endotelin	14
2.2.2.7. Anjiyotensin II	14
2.2.2.8. Vazokonstriktör Prostaglandin	15
2.2.3. Endotel Disfonksiyonu	15
2.2.4. Bevasizumabın Kardiyovasküler Yan Etkileri	15
GEREÇ ve YÖNTEMLER	17
BULGULAR	19
TARTIŞMA	41
SONUÇ	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC	Adrimisin-Siklofosfamid
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
ACh	Asetilkolin
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
bFGF	Fibroblast Growth Factor
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
COX	Cyclooxygenase
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EET	Epoksi Eikosa Trienoik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor
EKHF	Endotelyal Kaynaklı Hiperpolarizan Faktörler
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
Erk	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ET-1	Endotelin-1
Fe	Fenilefrin
FLT-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
FLT-4	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-4
GTP	Guanozin Trifosfat
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HIF1	Hypoxia-Inducible Factor-1
ICAM	Intercellular Adhesion Molecular
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IL	İnterlökin
iNOS	Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentetaz
KDR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2
L-NAME	NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester
LVEF	Left Ventricular Ejection Fraction
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC-V	Major Histocompatibility Antigen-V

nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
P38	Mitogen Activated Protein Kinase Protein 38
P53	Tumor Suppressor Gene 53
P73	Tumor Protein 73
PAF	Platelet Activating Factor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PDGF	Platelet Activated Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelium Vascular Cell Adhesion Molecule
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TAF	Tümör Anjiojenik Faktör
TF	Tissue Factor
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecular
VEFG-R	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Von Willebrand Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>	
2.1.	Anjiyogenezisin tümör büyümesinde rol oynadığı evreler	2
2.2.	Arter duvar yapısı	4
2.3.	Endotelden kaynaklanan mediyatörler	7
2.4.	Endotelden salınan vazoaaktif maddeler	8
2.5.	NO mekanizması	9
2.6	NO sentezlenmesi	10
2.7	eNOS aktivasyonu	11
2.8.	Endotelin mekanizması	14
4.1a.	Sıçan kuyruk arterinden ölçülen kan basınç trasesi (Başlangıç)	19
4.1b.	Sıçan kuyruk arterinden ölçülen kan basınç trasesi (Son Bevasizumab uygulanmasından sonra)	19
4.2a.	Fenilefrin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	20
4.2b.	Fenilefrin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	20
4.3.	Fenilefrin konsantrasyon yanıt eğrisi	21
4.4a.	Anjiyotensin II konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	21
4.4b.	Anjiyotensin II konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	22
4.5.	Anjiyotensin II konsantrasyon-yanıt eğrisi	22
4.6a.	Noradrenalin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	23
4.6b.	Noradrenalin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	24
4.7.	Noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrisi	24
4.8a.	Endotelin I konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	25
4.8b.	Endotelin I konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	25
4.9.	Endotelin I konsantrasyon-yanıt eğrisi	26
4.10a.	30 mM KCl'e kasılma yanıt trasesi (Bevasizumab)	27
4.10b	30 mM KCl'e kasılma yanıt trasesi (Kontrol)	27
4.11.	30 mM KCl'e kasılma yanıtları	28
4.12a.	Asetilkolin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	29
4.12b.	Asetilkolin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	29
4.13.	Asetilkolin Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi	30
4.14a.	Sodyum Nitroprussid konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)	31

4.14b.	Sodyum Nitroprussid konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)	31
4.15.	Sodyum Nitroprussid konsantrasyon-yanıt eğrisi	31
4.16a.	L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)	32
4.16b.	L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)	32
4.17.	L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi	33
4.18a.	L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)	33
4.18b.	L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)	34
4.19.	L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi	34
4.20a.	İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)	35
4.20b.	İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)	35
4.21.	İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi	36
4.22a.	İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)	37
4.22b.	İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)	37
4.23.	İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-4} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi	38
4.24a.	İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)	38
4.25b.	İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)	39
4.25.	İndometazin(10^{-5} M)+Karibdotoksin(10^{-7} M)+Apamin(10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkoln konsantrasyon-yanıt eğrisi	39

GİRİŞ VE AMAÇ

Bevasizumab, VEGF-R (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)'ye spesifik olarak bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Bevasizumab hümanize mürin antikorunun antijen bağlayan bölgeleri VEGF-R'ye bağlanan, insan antikoru temel bölgelerini içermektedir. Gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Çin hamsterlarının over memeli hücresi ekspresyon sisteminde rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) teknolojisi ile oluşturulur.

Bevasizumab, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)'nin endotelial hücreleri yüzeyinde Flt-1 (VEGF-R1) ve KDR (VEGF-R2)'ye bağlanmasını inhibe eder. VEGF'nin biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörün damarlanmasını ve dolayısıyla büyümesini yavaşlatır.

Bevasizumab ile tedavi edilen hastalarda %34'e kadar yükselen hipertansiyon görülme oranı (tüm dereceler) gözlenmiş, bu oran kontrol grubunda %14 olmuştur. Tüm endikasyonlara yönelik yapılan klinik çalışmalarda NCI-CTC derece 3 ve 4 hipertansiyonun genel görülme oranı bevasizumab ile tedavi edilen hastalarda %0.4-%17.9 aralığında yer almıştır. Bevasizumab ile tedavi edilen hastaların %1.0 kadarında derece 4 hipertansiyon (hipertansif kriz) ortaya çıkmış, bu oran bevasizumabsız kemoterapi tedavi alan hastalarda ise %0.2 olmuştur. Bevasizumab kullanımı sırasında gelişen hipertansiyon, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, diüretikler ve kalsiyum kanal blokörleri gibi oral hipertansiflerle tedavi edilmektedir. Yapılan çalışmalar ilaca bağlı oluşan hipertansiyonda endotel tabakasının sorumlu olabileceğini düşündürmüş olsalarda, bu konuda yapılmış kapsamlı bir çalışma yoktur.

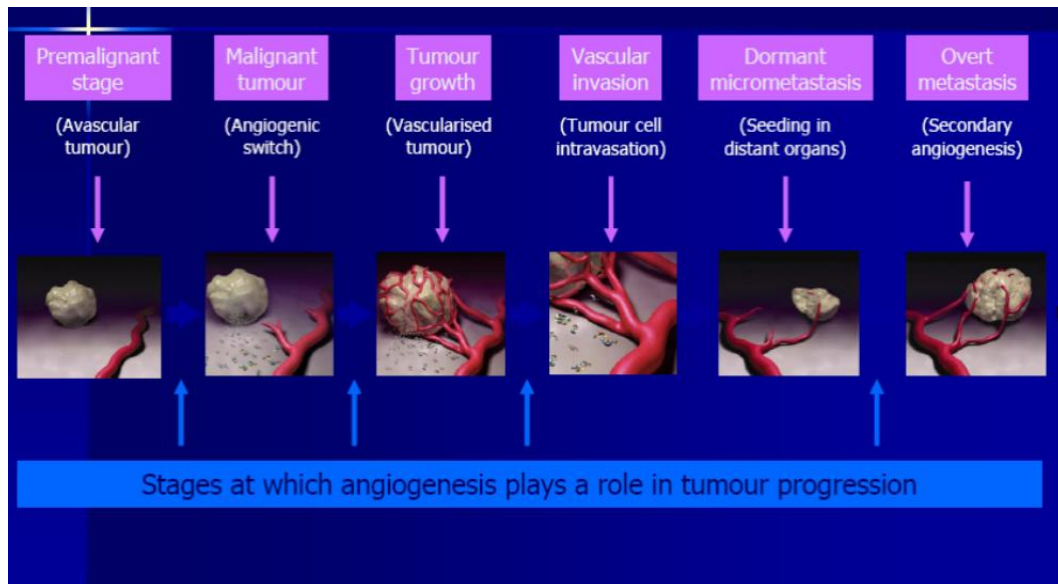
Bu çalışmada hipertansiyon oluşum mekanizmalarından biri olan damarın fizyolojik yanıtları üzerine bevasizumabın etkileri araştırılmıştır. Bulunan sonuçlar klinikte bevasizumabın kullanımı sırasında ortaya çıkacak hipertansiyonun tedavisinde gerekli ilacın seçimine yardımcı olabilir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Anjiyogenez

Tümörler, küçük hücre popülasyonlarına komşu olan kan damarlarından ekstrasvasküler mesafeden basit difüzyonla aldıkları besinlerle yaşamlarını sürdürebilir. Bu hücre kolonisinin çapı 1-2 mm'ye ulaştığında basit difüzyon, büyümeyi desteklemekte yetersiz kalır. Tümör hücreleri bundan sonra endotel hücreleri için mitojenik olan ve mevcut kan damarlarından yeni kapillerin oluşumunu stimüle eden VEGF gibi faktörler salgılar. Tümör damarlarının oluşması, tümöre besin temin ederek ve atık ürünlerin perfüzyonla uzaklaştırılmasıyla tümörlerin çapının 1-2 mm'den fazla büyümesine neden olur. 1971'de Folkman, tümörün en hassas olduğu dönemde (anjiyogenezden önce) TAF (Tümör Anjiyojenik Faktör)'ların bloke edilmesi sayesinde büyüme için gerekli besin ve oksijene ulaşımın önlenerek tümör büyümesinin sınırlanabileceği varsayımını ortaya atmıştır ve anti-anjiyojenik tedavi böylece solid tümörlerin büyümesinin kontrol altına alınmasında güçlü bir araç olabileceğini savunmuştur. 1989'da en güçlü TAF moleküllerinden biri olan VEGF, Ferrara ve Henzel tarafından keşfedilmiştir (1,2).

Tümör anjiyogenezi kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur ve anjiyogenezin kanser oluşumunun ilk evrelerinden uzak metastazların oluşmasına kadar tümör gelişimiyle ilgili olduğu bilinmektedir (3) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Anjiyogenezin tümör büyümesinde rol oynadığı evreler

Tümör dokusunun kendine yeni damar oluşturma süreci, salgıladığı anjiyojenik büyüme faktörleri sayesinde başlar. VEGF arterler, venler ve lenfatiklerden köken alan vasküler endotel hücreler için güçlü bir mitojendir ancak başka hücre tipleri için mitojenik aktivitesi yoktur (4).

Doğal VEGF (veya VEGF-A) bazik, heparine bağlanan, 45.000 dalton ağırlığında, homodimerik bir glikoproteindir. Bu, onun iki özdeş birimden oluştuğu anlamına gelmektedir. İnsan VEGF geninin farklı ekspresyonu 121, 165, 189 ve 206 amino asidi olan dört farklı molekül türünün oluşmasıyla sonuçlanır (4). Tümör hücrelerinde ve mikro çevresinde yer alan bazı immün hücrelerden salgılanan VEGF (A, B, C, D) endotel hücreleri yüzeyinde bulunan özgün reseptörleri VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR) ve VEGF-R3 (Flt-4) ile etkileşirler. Bunlardan VEGF-B sadece VEGF-R1'i uyarırken, VEGF-A hem VEGF-R1 hem de VEGF-R2'yi uyarabilir. VEGF-C, VEGF R2 ve R3'ü uyarabilir. VEGF-D ise sadece VEGF-R3'ü uyarabilme yeteneğine sahiptir. VEGF-R'ler uyarıldığında hücre içinde Ras/Raf/Erk, PI3K ve P38 MAPK yolları aktiflenmektedir. VEGF-R1 anjiyogenezden, VEGF-R2 anjiyogenez ve lenfanjiyogenezden, VEGF-R3 ise lenfanjiyogenezden sorumludur (4). VEGF molekülü tarafından aktiflenen endotel hücreleri de bazı parakrin faktörler salgılayarak perisitleri uyarırlar. Bunlar içerisinde en iyi bilineni PDGF (Platelet Activated Growth Factor)'dir. PDGF perisitlerin yüzeyinde bulunan PDGF reseptörüne bağlanarak hücre içinde Ras/Erk ve PI3K yollarını uyarır. Böylece hücre aktivasyonu ve damarın maturasyonu tamamlanmış olur(4).

Lenfanjiyogenez VEGF tarafından regüle edilir ve sıklıkla anjiyogeneze eşlik eder. Lenfatik damarlar sıvı, protein ve hücreleri taşır ve bunları venöz dolaşıma geri götürürler. Tümörlerin çevresindeki lenfatik çoğalma malign hücrelerin metastatik yayılımına yardımcı olabilir(5).

Anjiyogenez, birçok düzenleyici molekülün ekspresyonuyla yönetilen karmaşık bir süreçtir. Anjiyojenik süreçte rol alan en önemli molekül kuşkusuz VEGF'dir. Çeşitli faktörlerin VEGF sentezini artırdığı gösterilmiştir. Bu faktörler

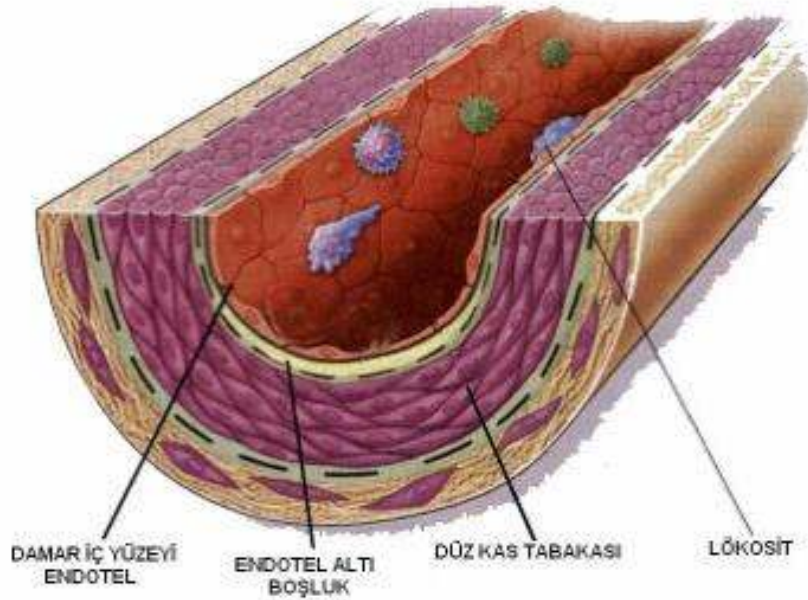
arasında çevresel faktörler (hipoksi, HIF1 α), büyüme faktörleri ve hormonlar (EGF, bFGF, PDGF, IGF-1, IL-1a, IL-6, östrojen), tümördeki bazı genetik mutasyonlar (p53, p73, svc, K-RAS, HRAS, rHc, bcr-abl) sayılmaktadır (6). Negatif düzenleyiciler trombospodin, plazminojen fragmanı, anjiyostatin ve kolajen XVIII fragmanı endostatini içerir. Pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik büyüme faktörlerinin sıkıca dengelenmiş ekspresyonu normalde düzensiz anjiyogeneze engel olur. VEGF hem fizyolojik (embriyogenez ve erken postnatal) hem de patolojik (tümör) anjiyogeneze rol oynar. VEGF'nin aktivitesi, hücre yüzeyi reseptörlerine, esas olarak hücresel etkilere çevrilen moleküler olayları uyaran intraselüler sinyal kaskadlarını stimüle eden VEGF R-2'ye bağlanarak indüklenir.

VEGF damar geçirgenliğini ve dolayısıyla interstisyel basıncı etkileyerek damarların hücrelere oksijen ve besinleri ulaştırmasını etkiler. Bu da VEGF sekresyonunu ve yeni, olgunlaşmamış kan damarlarının oluşmasını daha çok uyarır.

2.2. Endotel Yapısı ve Fonksiyonları

2.2.1 Endotel Yapısı

Endotel damar sistemi içinde yer alan ve birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda önemli düzenleyici rolü olan, kan ve damar duvarı (düz kaslar) arasına sınırlandırılmış, mezoderm kaynaklı tek katlı yassı epitelyum dokusu olup vücudumuzun en büyük organıdır (Şekil 2.2). Erişkin bir insanda endotel hücre kitlesi toplam ortalama 1 kg ağırlığında olup 1-7 m² lik bir yüzey oluşturmaktadır.



Şekil 2.2. Arter duvar yapısı

Yüzeyindeki glikoproteinler ile glikozaminoglikanların negatif yük kazandırdığı endotel hücreler, hücrel ve hormonal moleküllerle etkileşim içinde olduklarından çok sayıda reseptör taşımaktadırlar. 19. yüzyılın başında bu organın sadece kan ile organlar arasında bir bariyer olduğu düşünülürken, 1980' lerde endotelin vazoaktif rolü tariflenmiştir. Arteriyel sistem, doku seviyesinde yeterli kan akımının her bir kalp siklusu sonucu değişen kan basıncı ve kan akımına karşı uyumunu sağlayarak görevini yerine getirmektedir. Kan akımının sürdürülmesi ise vasküler yapıların direncinde meydana gelen değişiklikler sonucu sağlanmaktadır. Trombosit agregasyon inhibisyonu, koagülasyon aktivasyonunun inhibisyonu, fibrinolizis fonksiyonları ile pıhtılaşmayı önleyici bir yüzey oluşturmak, ayrıca doku ve dolaşım arasında madde alışverişi, vasküler tonusun düzenlenmesi, lökosit ve trombosit adezyonunun regülasyonu gibi görevleri vardır.

2.2.2. Endotelin Fizyolojik Özellikleri

Endotelin damar geçirgenliğindeki rolü, damarın tipine ve yerine bağlıdır. Lipofilik ve düşük molekül ağırlıklı hidrofilik maddeler engellenmeden kan ve dokular arasında hareket edebilirler. Ancak intravasküler ve ekstrasvasküler sıvı dengesinin sürdürülebilmesi için makromoleküllere karşı seçici bir geçirgenlik vardır. İnflamasyon, immün cevap ve yara iyileşmesi gibi olayların başlaması için hormon, antikor vb. moleküllerin geçişi gereklidir (7). Endotel lokal olarak birçok mediatör üretmekte ve bunlara karşı yanıt oluşturmaktadır. Robert Furchgott vd(8)'ın tavsan aortası üzerinde yapılan deneyle nörohumoral hücrelerin damar düz kası üzerine kasılma ve gevşemeden sorumlu olduğu görüşü değişmiştir. Bu deneyde araştırmacılar α -1 reseptörler vasıtasıyla düz kaslarda kasılmaya yol açan bir katekolamin olan noradrenalinin bulunduğu ortama, endotelial dokusu sağlam bir damar ile endotelial dokusu bozulmuş başka bir damar koymuşlar, daha sonra deney ortamına asetilkolin (ACh) eklemişlerdir. ACh eklenmesine, sağlam endotel dokusu olan damarlar vazodilatasyonla cevap verirken, endotel dokusu bozulmuş damarlar vazokonstriksiyon şeklinde cevap vermişlerdir. Araştırmacılar, bu deneyde saptanan farklılığı endotel dokuya bağlamışlar. Başlangıçta, damar yapısı içinde çok az yer kaplayan endotel dokunun, damar tonusu üzerine bu derece etkili olması olanaksız görülmüş. Daha sonra, vazodilatasyon ve difüzyon yeteneği olan bir faktörün, endoteli sağlam bir damardan endoteli soyulmuş bir damara taşınmasının gösterilmesi ile endotel dokusunun söz konusu fonksiyonu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte vasküler endotelin, dolaşımla çevre dokular arasında yalnızca yapısal bir bariyer olmadığı, aynı zamanda fizyolojik ve patolojik uyarılara yanıt olarak vasküler hemodinamiyi etkileyen mediyatörler salgıladığı bilinmektedir (Şekil 2.3). Bu mediatörlerin koordineli bir şekilde çalışmasıyla düz kas hücrelerini etkileyerek vasokonstriktör ve vazodilatör etkilerin dengelenmesiyle doku kanlanması ve kan akımına katkıda bulunmaktadırlar (Şekil 2.4).

● Küçük moleküller

- Histamin
- Serbest radikaller
- EDRF = Nitrik Oksit
- Endotel kökenli konstrüktör faktör
- Endotelyal kaynaklı hiperpolarizan faktör (EKHF)
- Adnedozin
- C tipi atriyal natriüretik faktör
- Anjiyotensin II
- Endotelin-1

● Lipidler

- Prostaglandinler (prostasiklin(PGI₂), tromboksan-A₂)
- Lökotrienler
- PAF (Platelet Activating Factor)

● Proteinler

- Büyüme faktörleri (PDGF)
- Adezyon moleküller;
 - ICAM (Intercellular Adhesion Molecular)
 - VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecular)
- PECAM (Platelet Endothelium Vascular Cell Adhesion Molecule)
 - E-selektin
 - P-selektin

- Matriks proteinleri;
 - Heparan sülfat
- Pıhtılaşma faktörleri;
 - TF (Tissue Factor)
 - t-PA (Tissue Plasminogen Activator)
 - PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)
 - TM
 - vWF (Von Willebrand Factor)
- Antijenler;
 - MHC-V (Major Histocompatibiliti Antijeni-V)
- Enzimler;
 - ACE
- Reseptörler

Şekil 2.3. Endotelden kaynaklanan mediyatörler

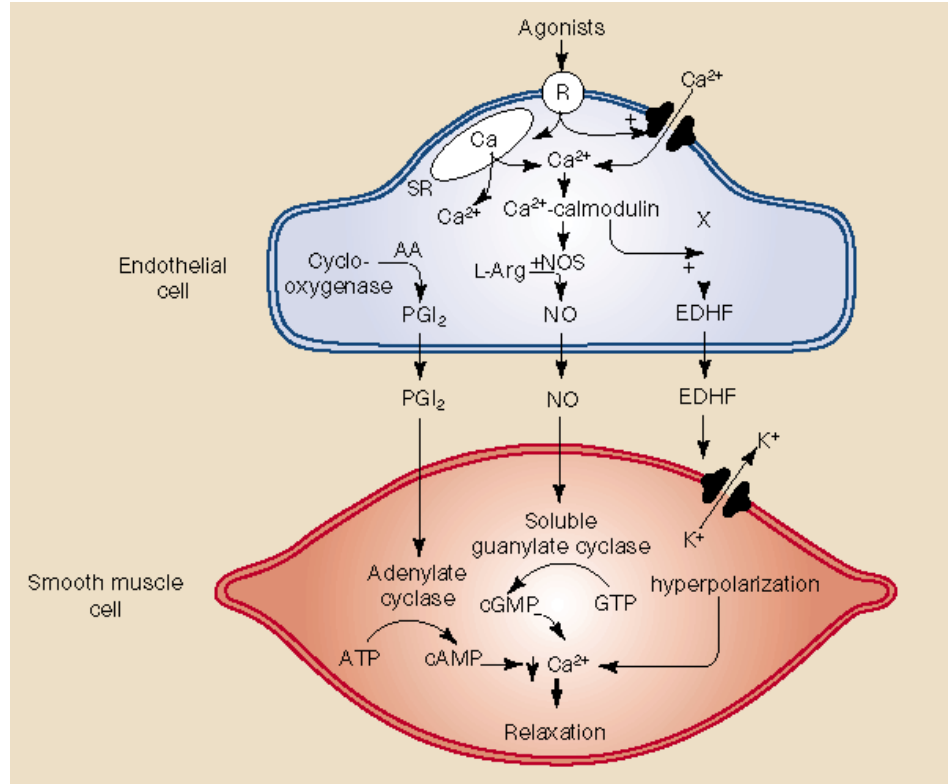
Vazodilatörler			Vazokonstriktörler
Nitrik Oksit			Endotelin-1
Prostasiklin			Anjitenzin II
Endotel Kaynaklı Faktör	Relaksan		Endotel Kökenli Konstriktör Faktör
Adenozin			Platelet Aktive Edici Faktör
Bradikinin			Tromboksan A2
Adrenomodulin			Prostaglandin H2
			Serbest Radikaller

Şekil 2.4. Endotelden salınan vazoaktif maddeler

2.2.2.1 Nitrik Oksit (NO)

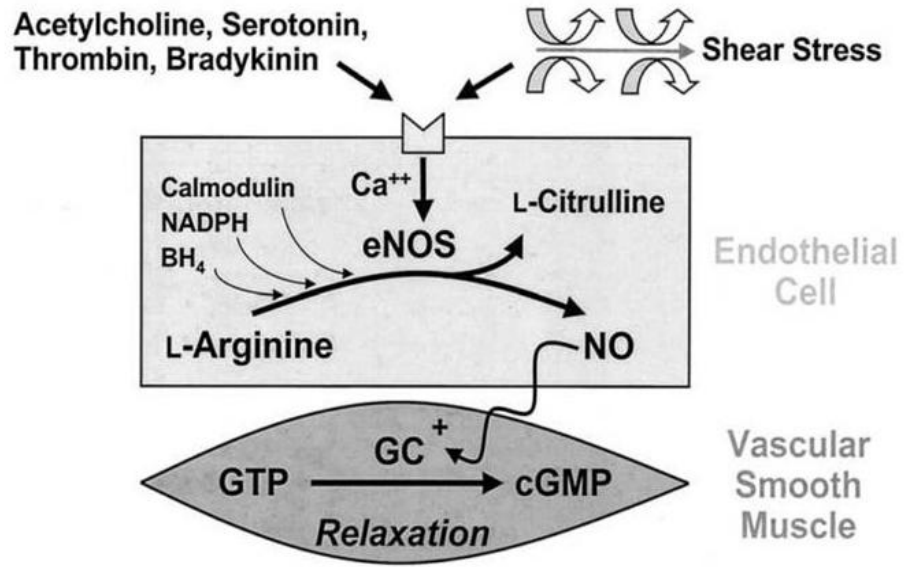
NO uzun yıllar arabaların egzoz gazında, fosil yakıtlarının dumanında ve sigara dumanında bulunan ve ozon tabakasının azalmasından sorumlu tutulan zararlı bir çevre kirleticisi olarak görülüyordu. Ancak iki atomlu bu basit molekülün fizyolojik rolüne yönelik ilgi 1980 yılında Furchgot ve Zawadski(9)'nin tariflediği endotel kökenli gevşetici faktörün 1987 yılında Palmer ve arkadaşları tarafından NO olduğunun gösterilmesinden sonra artmıştır. NO, 1992 yılında Science dergisi tarafından yılın molekülü seçilmiştir. 1998 yılında Furchgot, Zawadski, Louis, Ignora ve Ferid Murad'a Nobel fizyoloji ödülü kazanmasına Nitrik oksidin kardiyovasküler sistemde sinyal molekülü olmasıyla ilgili keşifleri neden olmuştur.

NO, depolanmayan ve etki bölgesine serbestçe difüze olan kovalent bağla bağlı iki atomlu bir gazdır. Endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak da bilinen nitrik oksit eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir moleküldür. NO'nun bu özelliği onu eşsiz bir mesajcı yapar. Yani yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçer, eşleşmemiş bir elektrona sahip olması nedeni ile hızlı reaksiyona girer. Yarılanma süresi sadece 3-5 saniyedir. NO, endotelden sentezlendikten sonra vasküler düz kas tabakasına difüze olur. Burada guanilat siklazın hem içeriğine bağlanarak bu enzimi aktif hale getirir. Aktif hale gelmiş guanilat siklaz, guanozin 5-trifosfattan (GTP) siklik guanozin monofosfat (cGMP) oluşmasını katalizler. cGMP hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek vasküler düz kasın vazodilatasyona neden olur(Şekil 2.5).



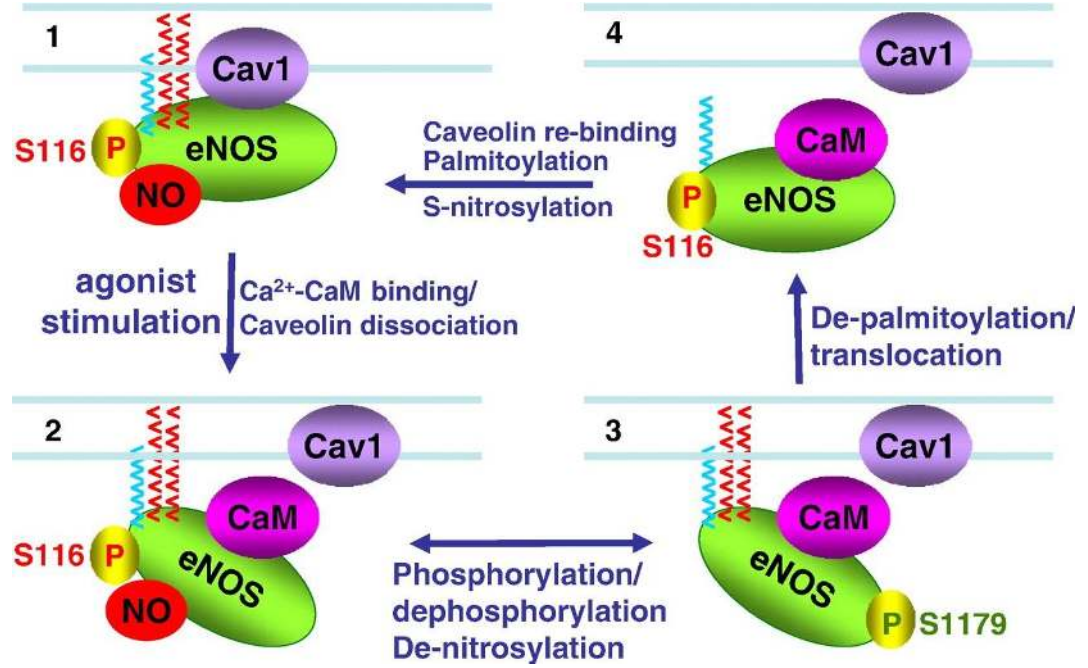
Şekil 2.5. NO mekanizması

NO salınmasıyla vasküler yapıların tonusu belirlenmektedir. NO salınmasına neden olan uyarıcılar asetilkolin, kan akımı (shear stress), bradikinin, katekolamin, serotonin, ADP, ATP, kalsiyum gen ilişkili peptid, histamin platelet aktive edici faktör thrombin Substance-P'dir. NO vücutta bulunan bir aminoasit olan L-arjininden sentezlenmektedir (10). Bu metabolik yolda görev alan enzim ise nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimidir (Şekil 2.6). NOS'in genetik olarak farklı üç izoformu tespit edilmiştir. Bunlar; düşük miktarda üretilerek vasküler tonüsü ayarlayan bir konstitütif endotelial izoform (eNOS), yine düşük miktar üretilen sinaptik şekillenme ve nörotransmisyonu düzenleyen bir konstitütif nöronal izoform (nNOS) ve yüksek miktarda üretilerek, immün/inflamatuar olaylarda rol alan ve hücre aracılı immün cevapta etkili bir komponent olan uyarılabilir form (iNOS)'dur. nNOS ve eNOS izoenzimleri NO üretimi için Ca^{++} kalmodulin kompleksine bağımlıdır, buna karşın iNOS bundan bağımsızdır. NO sentezi ile ilgili ilk bilgiler inflammatuar hücreler (makrofaj vb.) üzerinde yapılan gözlemlerle elde edilmiştir. İnaktif inflammatuar hücrelerde NO saptanmazken bu hücrelerin aktive edilmesiyle NO salgıladıkları saptanmıştır. Bu nedenle inflammatuar hücrelerdeki NOS indüklenebilir NOS (iNOS) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra inflammatuar hücrelerin aksine endotelial ve nöronal dokuların sürekli olarak NO üretilip, salgıladığı saptanmış ve bu dokulardaki NOS a 'sürekli çalışan NOS' (sNOS) ismi verilmiştir. Daha sonra köken aldıkları dokulara göre eNOS (endotelial) ve nNOS (nöronal) olarak isimlendirilmişlerdir.



Şekil 2.6. NO sentezlenmesi

Yapılan çalışmalar sonucunda eNOS, hücre zarının invajinasyonu ile oluşan ve içinde transmembran protein olan kaveolinin bulunduğu kaveola diye isimlendirilen yerde bulunmaktadır. Kaveola, endotel hücre zarının en önemli özelliğini taşımaktadır. Aynı yapı kalp miyositlerinde ve birçok hücrede bulunmaktadır. Normalde kaveolin eNOS'un görev yapmasını engellemektedir fakat bu etkiyi kalsiyum-kalmodülin kompleksi ortadan kaldırmaktadır. Endotele dışardan uyarı geldiğinde hücre içi kalsiyum yoğunluğu artmakta, kalsiyum ile kalmodulin kompleks oluşturarak eNOS'a bağlanmak suretiyle bu etkiyi ortadan kaldırmaktadır. NO sentezi ortamda kalsiyum miktarı düşünceye kadar devam etmektedir. Kalsiyum belirli bir değere ulaştıktan sonra kalmodulin-eNOS ayrılmakta ve eNOS ile kaveolin tekrar kompleks oluşturmaktadır (Şekil 2.7). NOS, NO sentezi için bir amino asit olan L-arjinini kullanmaktadır. L-arjinin üre döngüsünün sonunda oluşmakta, kanda $100 \mu M$ konsantrasyonunda bulunmaktadır. Endotel hücresinde ise L-arjinin yoğunluğu birkaç yüz mikromolardan, birkaç bin mikromolara kadar değişmektedir.



Şekil 2.7. eNOS aktivasyonu

NO'nun vasküler yapıların tonusunun belirlenmesindeki rolünün yanında başka etkileri de bulunmaktadır (11). Trombositlerin damar duvarına yapışması ve birikmesi nitrovazodilatörlerle engellenmektedir. Dolayısıyla endotelin ürettiği NO'nun böyle bir etkisinin bulunması şaşırtıcı değildir. NO, nitrovazodilatörlere benzer şekilde prostasiklin ile sinerji göstererek trombositlerin damar duvarına yapışmasını ve birikmesini engellemektedir. Bu etki endotelin antitrombotik özelliğinin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Biriken trombositlerden salınan ADP, Serotonin ve aynı zamanda trombin, endotelin üzerinde bulunan özel reseptöre bağlanarak NO salınmasına neden olmaktadır. NO trombositlerde yüzeyde P-selektinin oluşmasını ve fibrinin glikoprotein 2b-3a reseptöre bağlanması için gerekli olan şekil değişikliğinin oluşmasını da engellemektedir. Aynı zamanda trombositlerde de NOS bulunmakta, dışardan verilen L-arjinin trombositlerden NO sentezini artırarak trombositlerin aktif hale gelmesini engellemektedir.

Endotel normalde antiinflamatuvar özelliğe sahiptir. Bu özelliği aterosklerozun önlenmesinde de önemli bir yere sahiptir. NO, lökositlerin endoteline yapışmasını engellemek suretiyle antiadeziv ve antiaterosklerotik özellik göstermektedir. NO metabolizması sonucunda idrarda ve plazmada nitrat ve nitrit oluşmaktadır. Plazmada NO'nun oksidasyonu sonucunda nitrat oluşmakta, kanda ise nitrat stabil olmadığı için çabucak nitrite dönüşmektedir. Kandaki nitrit konsantrasyonu nitrat konsantrasyonundan 100 kat daha fazladır.

2.2.2.2 Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktörler

Bir çok çalışmada NO ve prostasiklinin dışında endotel kaynaklı başka yapıların vazodilatör etkisi tanımlanmıştır. Bu çalışmalarda asetilkoline karşı NOS ve

siklooksijenaz inhibitörleri ile engellenemeyen vazodilatör yanıtlar rapor etmişlerdir. Daha sonra benzer vazodilatör yanıt bradikinin ve substant P ve shear stres'e karşıda elde edilmiştir. Bu vazodilatör yanıtın potasyum kanallarının bloke edilmesi ile ortadan kalktığı gösterilmiştir (12). Bu vazodilatasyon, düz kaslardaki K^+ kanallarının açılması ile hücre dışına K^+ çıkması sonucu hücrenin hiperpolarize olması ve bunun sonucunda da voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının kapanması ile hücre içine Ca^{++} akışının durmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle söz konusu faktöre Endotel Kaynaklı Hiperpolarizan Faktör (EKHF) denilmiştir. EKHF insanda ilk kez mezenterik arterde gösterilmiştir. Daha sonra, insan koronerinde bradikinin ile oluşan vazodilatör yanıttan sorumlu olan asıl faktörün EKHF olduğu saptanmıştır. EKHF nin küçük damarlar (rezistan arterler) üzerine olan etkisi, büyük damarlardan oldukça fazladır. Bunun tersine NO'nun büyük damarlar üzerine etkisi belirgindir. Bu, küçük damarlarda NOS aktivitesinin, küçük damarlarda düşük olması ile uyumludur. NO de düz kas hiperpolarizasyonu ile vazodilatasyon yapar fakat bu etki EKHF ile kıyaslandığında önemsizdir. Domuz koroner arterindeki endotel tabaka sıyrıldığında düz kas hücrelerinin depolarizasyonla sonuçlanmıştır (EKHF'nin hiperpolarizan etkisi kaybolur). Bu bulgu endotel hücrelerinin sürekli olarak EKHF salgıladığını akla getirmektedir. NO, EKHF üretimini inhibe eder. Hastalık nedeniyle NO biyoyararlanımı düştüğü zaman endotelial vazodilatör yanıt EKHF up-regülasyonu ile devam ettirilir. Yaş ve uzun süreli hiperkolesterolemi insanda periferik arteriyollerde NO gibi EKHF'nin de azalmasına neden olur. Yine EKHF, NO gibi güçlü antiinflamatuvar etkiye sahiptir.

EKHF'nin hangi molekül veya moleküllerden oluştuğu açıklık kazanmamıştır. Olası EKHF adaylarının farklı damar yatakları üzerinde farklı etkiler göstermesi birden çok EKHF molekülü olabileceğini akla getirmiştir. Bu moleküllerden bir tanesi araşidonik asit metabolitlerinden olan Epoksi Eikosa Trienoik Asit (EET). Hayvan koroner arterlerinde yapılan deneylerde, asetilkolin, bradikinin ve araşidonik asidin endotelden EETs salarak vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (13). Son zamanlarda H_2O_2 'nin de EKHF gibi hiperpolarizasyona bağlı vazodilatasyon yaptığı gösterilmiştir (14).

2.2.2.3 Prostaglandin

Eikozanoidler yirmi karbon atomlu yağ asitlerinden türeyen ve güçlü biyolojik etkinlik gösteren endojen maddelerdir. Eikozanoidler, prekürsör yağ asitlerinden oluşmalarında rol oynayan enzim türüne göre siklooksijenaz ürünleri, lipoksijenaz ürünleri ve sitokrom 450 monoksijenaz ürünleri şeklinde üç ana gruba ayrılırlar. Prostaglandinler diye de adlandırılan siklooksijenaz ürünü eikozanoidler, prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlardır. Siklooksijenaz enzimleri (COX-1 ve COX-2) araşidonik asidin, adı geçen prostanoitlerin prekürsörleri olan prostaglandin G ve H'ye dönüşümünü katalize eder. Bu enzimlerin diğer adı prostaglandin G/H sentazdır. Prostaglandinler (PG'ler), karbon zincirinin ortasında bir siklopentan halkası bulunan eikozanoidlerdir. Siklopentan halkasındaki substituentlerin durumuna göre E, F, D, A, B ve C diye gruplara ayrılırlar. Primer prostaglandinlerin çeşitli hücre tiplerinde yaygın şekilde dağılmış ve biyolojik yönden önemli olanları, E ve F grubu prostaglandinlerdir. Her bir grup içindeki üyeler, alfabetik yan zincirler içindeki doymamış bağ sayısını gösteren ve grubu

belirleyen harfin alt kısmına konulan 1, 2 veya 3 sayıları ile simgelenirler. Prostaglandinler, yapıcı prostaglandinlere çok benzerler ve bazı kaynaklarda prostaglandin olarak kabul edilirler. Prostaglandinlerden kimyaca farkı, siklopentan halkasına ilave olarak, C-6 ve C-9 arasında yerleşen oksijen köprüsü nedeniyle ikinci bir halka daha içermeleri yani monosiklik değil bisiklik olmalarıdır. Diğer prostaglandinlerin aksine bütün hücrelerde değil, esas olarak endotelde ve az miktarda olmak üzere damar düz kas hücrelerinde yapılmaları ile de prostaglandinlerden ayrılırlar.

Vücuttaki ana prostasiklin olan prostaglandin I_2 (PGI_2)'nin büyük kısmı damar endotel hücrelerinde yapılır. Yukarıda belirtilen E ve F grubu prostaglandinlerden farklı olarak PGI_2 kanın akciğerlerden geçişi sırasında fazla yıkılmaz, hatta önemli ölçüde akciğer damar yatağından kana salıverilir. Prostaglandinler damar içinde trombus oluşmasını engelleyen en önemli etkenlerdir.

Stabil olmayan çok kısa etkili birleşiklerdir. Prostaglandin siklooksijenaz enzim aktivasyonu ile endotelden kaynaklanan güçlü bir vazodilatördür. Fizyolojik şartlarda prostasiklin üretimi düşük düzeyde olmasına rağmen ateroskleroz varlığında üretimi artmıştır. Koroner aterosklerozlu yada risk faktörü olan hastalara aspirin verilerek siklooksijenaz inhibisyonu ile prostasiklinin istirahat epikardiyal ve rezistans arterlerin tonusunda, akıma bağlı dilatasyon ve metabolik vazodilatasyonda önemli rol oynadığı ortaya konmuştur.

PGI_2 araziidonik asitten sentezlenir, yarılanma süresi 10 sn'dir. Salınımını uyaran faktörler pulsatil basınç, bradikinin, trombin, serotonin ve trombosit kökenli büyüme faktördür (15).

PGI_2 kondüit ve rezistans damar tonusuna, akıma bağlı dilatasyona katkıda bulunur. Bu yüzden prostasikline bağlı koroner vazodilatasyon NO eksikliği olan ortamda önemli bir kompensatuar mekanizma olarak rol oynar.

2.2.2.4 Adenozin

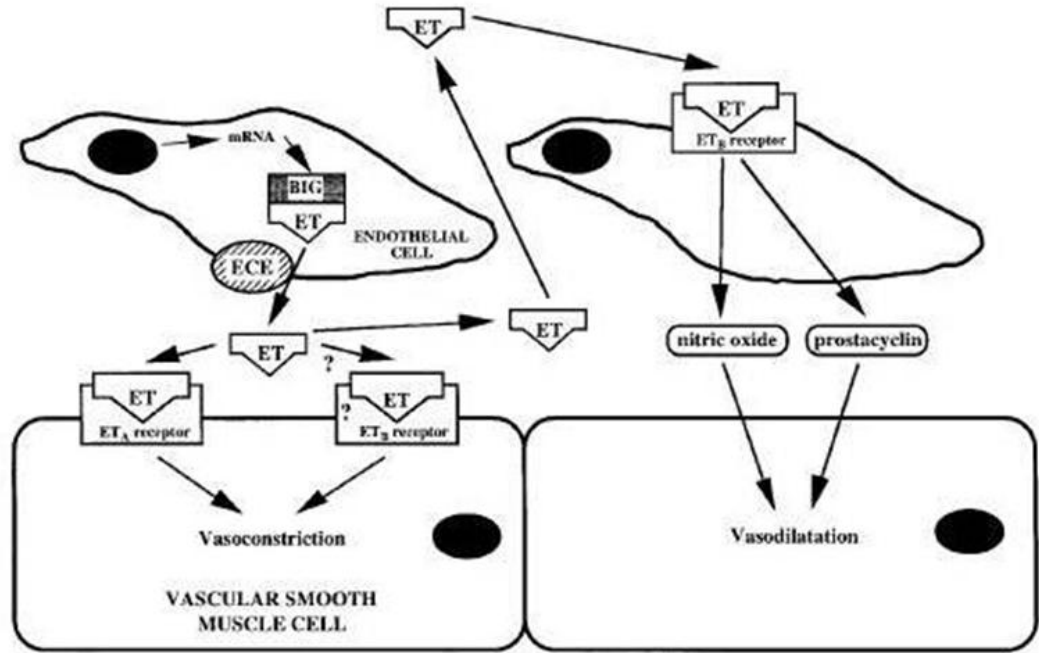
Adenin nükleozit (adenozin) ve nükleotitler (ATP ve ADP) akım artışı ve de trombus gibi uyaranlarla endotelial dokudan salgılanırlar. Adenozinin düz kaslardaki P_1 reseptörlere bağlanması cAMP üretimiyle sonuçlanır ve vazodilatasyon oluşur. Adenozinin hem endotel hücresinde hemde düz kas hücresinde P_2 reseptörü vardır. Endoteldeki P_2 reseptörün uyarılması EDRF/prostasiklin üretimi ve vazodilatasyon, düz kastaki P_2 reseptörün uyarılması ise vazokonstriksiyon ile sonuçlanır. Endotelial dokunun ATP ve ADP'yi adenozine çeviren ekstrasellüler ektonüleotidaz enzim sistemi vardır. Böylece bu moleküllerin lokal konsantrasyonu kontrol edilir. Bu fonksiyon, trombuslardan salgılanan ADP'nin adenozine çevrilerek etkisinin bertaraf edilmesinde önemlidir. Adenozin, ATP, ADP'ye damarın vereceği vasküler cevabı, bu moleküllerin miktarı ve fonksiyonel endotelin varlığı belirler. Miyokardiyal oksijen arz-talep arası dengesizlik ve koroner kan akımı artışına bağlı olarak adenozin üretiminde artış meydana gelir.

2.2.2.5 Bradikinin

Bradikinin, kinin ailesinin bir üyesi olup bir doku hormonudur. Endotel hücrelerinde yerleşmiş bradikinin'in reseptörleri ile birleşmesi neticesinde gelişen bir dizi reaksiyonla NO sentezini uyarır. Bu şekilde indirekt olarak vazodilatasyona neden olur. Ayrıca, bradikinin reseptörleri aracılığı ile direkt düz kas gevsemesine neden olabilir (16).

2.2.2.6 Endotelin

Üç alt gruptan oluşurlar. Bunlar; endotelin-1 (ET1), endotelin-2 (ET2) ve endotelin-3 (ET3)'tür. İlk olarak ET1, 1988 yılında Yanagisawa vd(17) tarafından vasküler endotel hücrelerinde saptanmış ve bilinen en potent endojen vazokonstriktör olarak tanımlanmıştır. Sadece ET-1 endotelden salgınır. ET-1, düz kaslardaki ET-A ve ET-B reseptörleri ile vazokonstriksiyon yapar (Şekil 2.8). Endoteldeki ET-B reseptörüne bağlanması ile endotelden NO salınımına ve vazodilatasyona yol açar. ET1'in yapımı ve salgınının en potent düzenleyicisi, fizyolojik bir faktör olan kan akımıdır. Kan akımındaki artış vazodilatasyona neden olur. Bunu endotel hücrelerindeki "yüzey stress" reseptörlerini aktive ederek yapar. Böylece NO sentezlenir ve salgınır, ET-1 yapımı ve salgını ise azalır.



Şekil 2.8. Endotelin mekanizması

2.2.2.7 Anjiyotensin II

Endotel hücrelerinde anjiyotensin reseptörlerine bağlanarak vazokonstriksiyon yapar. Anjiyotensin II damar düz kas hücrelerinde katekolaminlere yanıtı artırır ve süperoksit anyon yapımını artırır, NO yapımını ise azaltır. ET-1 sekresyonunu artırır.

2.2.2.8 Vazokonstriktör Prostaglandinler

Arasidonik asidin siklooksijenaz ile metabolizması sonucu oluşan PGH_2 ve TxA_2 damar düz kas hücrelerindeki endoperoksit ve tromboksan reseptörleri üzerine etki ederek vazokonstriksiyon meydana getirir.

2.2.3 Endotel Disfonksiyonu

Endotel tabakasının normal işlev görmesi endotel bağımlı dilatasyon faktörleri ve endotel bağımlı vazokonstriksiyon faktörleri arasındaki dengeye bağlıdır. Bu denge bozulduğunda endotel disfonksiyon oluşur (18). Endotel disfonksiyonu, vazodilatatör maddelerin biyoyararlanımındaki azalma ile karakterize olup en belirgin olanı NO azalmasıdır. Bu çerçevede endotel kaynaklı vazokonstriktörler artar. Bu dengesizlik, endotel disfonksiyonunun karakteristiği olan endotel bağımlı vazodilatasyonda azalmaya yol açar. Endotel disfonksiyonu terimi, genellikle endotel bağımlı vazodilatasyondaki bozulmayı tanımlamak için kullanılmasına karşın, lökosit, trombosit ve düzenleyici maddeler ile endotel arası ilişkideki anormalliklerle, normal dışı endotel aktivasyonuna yol açan durumları da kapsar(19).

2.2.4 Bevasizumabın Kardiyovasküler Yan Etkileri

Bevasizumabın erken dönemde önemli kardiyotoksisiteyi tanımlanmıştır ve kardiyak olaylar faz 3 çalışmada yakından izlenmiştir. Toplamda 3784 metastatik meme kanseri hastalarda kemoterapi ile beraber bevasizumab alan veya bevasizumab almayan meta analiz beş randomize çalışmada konjestif kalp yetmezliği araştırılmıştır. Yüksek grade konjestif kalp yetmezliği bevasizumab alan hastalarda %1,6 , almayanlarda %0,4 olarak bulunmuştur. Yine bevasizumab ile tedavi edilen hastalarda konjestif kalp yetmezliği gelişme riski (4,74 p=0,001) kontrol/plasebo koluna göre daha yüksek bulunmuştur (20).

Bevasizumabın 1. basamak kullanıldığı başka bir meta analizde hipertansiyon riskini beş kez artırdığı, kardiyovasküler disfonksiyonu ise üç kez artırdığı rapor edilmiştir. 1745 hastanın katıldığı ve bu hastalardan 963'nün bevasizumab kullandığı (%24'ü meme kanseri) çalışmada tromboembolik olayların %4'ünün bevasizumab ve kemoterapi alan hastalarda, %2'sinin ise yalnız kemoterapi alan hastalarda gözlemlendiği rapor edilmiştir (21). Mortalite ile ilişkili tromboembolik olaylar ise %0,8 oranında bevasizumab ve kemoterapi kombine kullanan hastalarda, %0,4 yalnız kemoterapi alan hastalarda rapor edilmiştir (22).

Metastatik meme kanseri bevasizumab ve kemoterapi alan hastalarda yapılmış 5 randomize klinik çalışma analiz edilmiş. Bu çalışmalarda önemli kardiyovasküler advers olaylar rapor edilmiştir. AVODA çalışmasında bevasizumab dozu ile hipertansiyon arasındaki ilişki gösterilmiş ve bu çalışmada yüksek doz bevasizumab ile tedavi edilen hastalarda kardiyotoksisite yüksek oranda gözlenmiştir (23).

ECOG-2104 non randomize faz 2 çalışmasında 226 hasta değerlendirilmiştir. Bütün hastalar bevasizumab almış 104 hasta eş zamanlı doz yoğun AC(adrimisin-siklofosfamid) almıştır veya takiben 122 hasta paklitaksel almıştır. Sırasıyla grade 3 hipertansiyon %11 ve %2 oranında gözlenmiştir (24).

80 hasta ile yapılan faz 2 çalışmasında önce doz yoğun AC, takiben nab-paklitaksel alan hastalarda %13,6 hastada garde 3 hipertansiyon rapor edilmiştir. Hiçbir hastada semptomatik LVEF disfoksasyonu gözlenmemiş ama asemptomatik ve geçici LVEF sırasıyla %1,2 ve %5 oranında gözlenmiştir (25).

Bevasizumab farklı adjuvan çalışmalarda araştırılmıştır. Bu çalışmalardan biri olan ECOG-5103 çalışması bevasizumab ilk 200 hastada bevasizumab adıktan sonra 6 hastada konjestif kalp yetmezliği hastalığı geliştiği için geçici süre durdurulmuştur. Ancak hiçbir hasta kardiyak problemlerden dolayı ölmemiştir. Çalışma tekrar değerlendirilerek yeniden yürütülmüştür.

Bevasizumab bu çalışmalarda hipertansiyon, azalmış LVEF ve artmış kalp yetmezliğine neden olabileceği değerlendirilmiştir. Bevasizumabın kardiyak güvenliği ile ilgili çeşitli çalışmalar halen sürdürülmektedir. Bu çalışmada hipertansiyon oluşum mekanizmalarından biri olan damarın fizyolojik yanıtları üzerine bevasizumabın etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

56 adet 9-12 haftalık Wistar türü sıçanların 28'i kontrol ve 28'i ise bevasizumab olarak iki grubu ayrılmıştır. Bevasizumab grubuna 35 mg/kg bevasizumab (İP) 21 günde 1 toplam 3 defa uygulanmıştır ($t_{1/2} \cong 20$ gün, 11-50 gün). Bevasizumab insanlarda 5-20mg/kg dozunda kullanılmaktadır. Sıçanlarda kullanılacak dozu belirlemek için 5, 10, 15, 25, 35, 45 mg/kg uygulanıp kan basıncı kuyruk arterinden ölçülmüştür. Sistolik kan basıncı artışı ≥ 35 mg/kg'de görülmesi nedeniyle kullanılacak doz 35 mg/kg olarak belirlenmiştir. Sistolik kan basıncı başlangıçta ve sakrifikasyon öncesinde kuyruk arterinden ölçülmüştür. İlk uygulamadan yaklaşık 2 ay sonra üretan anestezisi uygulanan sıçanların abdominal kaviteleri linea alba üzerinden yapılan insizyon ile açılmış, abdominal aorta heparinize (1000 ünit/kg iv) edildikten sonra çıkarılmıştır. 4°C'de %5 CO₂ ve %95 O₂ ile gazlanmış Krebs solüsyonu içeren petri kabıyla laboratuvara taşınmıştır. 3-4 mm boyunda halkalar halinde kesilip organ banyosuna asıldıktan sonra 37°C'de %5 CO₂ ve %95 O₂ ile gazlanmış aşağıdaki içeriğe sahip Krebs solüsyonu ile her 15 dakika bir yıkanarak 60 dakika dinlendirilmiştir. (mM): Distile su içinde NaCl 118.4, KCl 4.7, MgSO₄ H₂O 1.2, KH₂PO₄ 2H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5 ve glikoz 11.1.

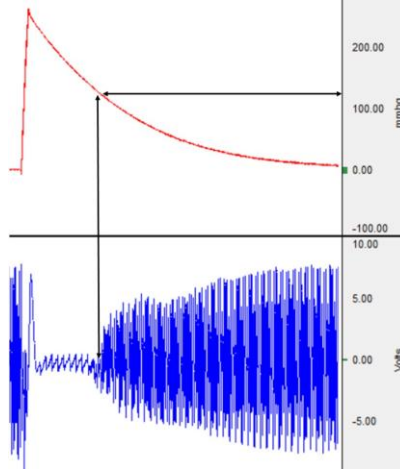
Deneyin ilk aşamasında her iki grup üzerinde fenilefrin (10^{-11} – 10^{-6} M), anjiyotensin II (10^{-11} – 10^{-6} M), noradrenalin (10^{-11} – 10^{-6} M), endotelin 1 (10^{-11} – 10^{-6} M) ile kümülatif, tek doz KCl (30 mM) ile kasılma yanıtları incelenmiş ve bu amaçla abdominal aorta halkalarında konsantrasyon yanıt eğrileri elde edilmiştir. 30 mM KCl içeren fizyolojik tuz solüsyonu, yukarıda içeriği verilen Krebs solüsyonun KCl değeri 30 mM, NaCl değeri 93 mM ve diğer kimyasalların konsantrasyonları aynı kalacak şekilde hazırlanmıştır.

Deneyin ikinci aşamasında her iki grupta endotel bağımlı gevşemeler incelenmiştir. Submaksimal konsantrasyonda fenilefrin ile ön kasılma oluşturulan abdominal aorta halkalarında asetilkolin (10^{-11} – 10^{-6} M) ve endotel-bağımsız gevşeme oluşturan sodyum nitroprusid'e (10^{-11} – 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri oluşturulmuştur.

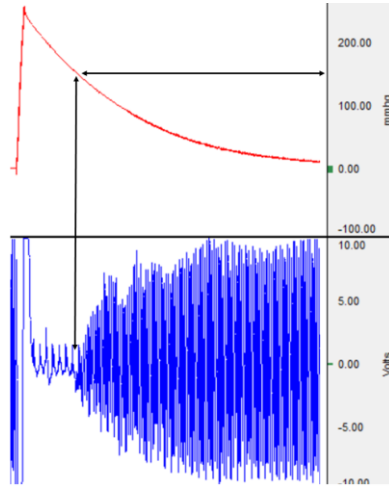
Gevşeme yanıtlarındaki değişikliklerin mekanizmalarının araştırılması için de yapısal ve indüklenabilir nitrik oksid sentetaz izoformlarının inhibitörü olan L-NAME (10^{-5} M), NO prekürsörü L-arjinin (10^{-5} M), siklooksijenaz inhibitörü İndometazin (10^{-5} M), indometazin (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkubasyon sonrasında 10^{-6} M fenilefrin ile ön kasılma oluşturulan abdominal aorta halkalarında asetilkolin (10^{-11} – 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri kaydedilerek damar düz kas tonusu fonksiyonu üzerine NO ve siklooksijenaz ürünlerinin rolü araştırılmıştır. Ayrıca indometazin (10^{-5} M) + büyük kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen potasyum (BKCa) kanal blokörü karibdotoksin (10^{-7} M) + küçük kondüktanslı kalsiyumla aktive edilen potasyum (SKCa) kanal blokörü apamin (10^{-7} M) kombinasyonu ile 30 dakika inkubasyon sonrasında 10^{-6} M fenilefrin ile önkasılma oluşturulan abdominal aorta halkalarında asetilkolin (10^{-11} – 10^{-6} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir.

Sıçanların her birinden alınan abdominal aortalardan mümkün olduğu kadar fazla halka elde edecek şekilde hesaplamalar yapıp gereken sıçan sayısı düşürülmüştür. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak verilmiştir. Gevşeme yanıtları oluşan kasılmanın yüzdesi olarak verilmiştir. İstatistiksel analizler Non lineer regresyon testi ve Student T testi ile yapılmıştır. Grafik ve istatistiksel analiz için GraphPad Software (6.0 versiyonu) kullanılmıştır. $P<0,05$ istatistiksel olarak anlamı kabul edilmiştir.

BULGULAR

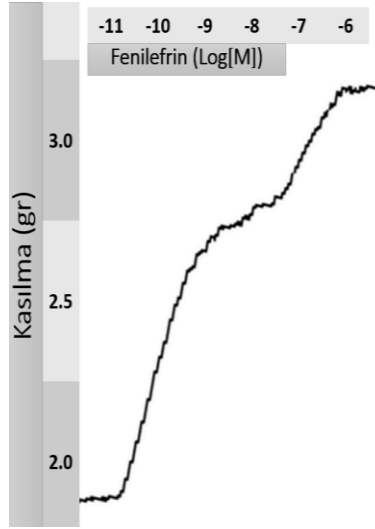


Şekil 4.1a. Sıçan kuyruk arterinden ölçülen kan basınç trasesi (Başlangıç)

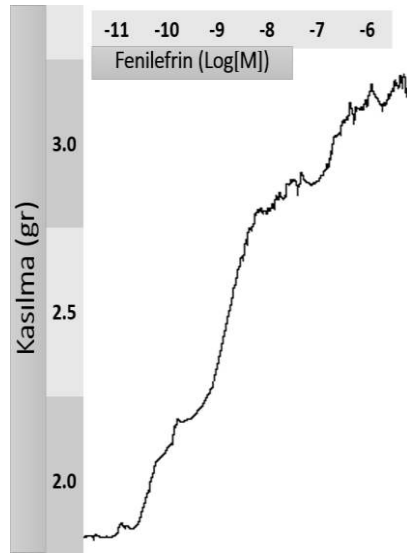


Şekil 4.1b. Sıçan kuyruk arterinden ölçülen kan basınç trasesi (Son bevasizumab uygulanmasından sonra)

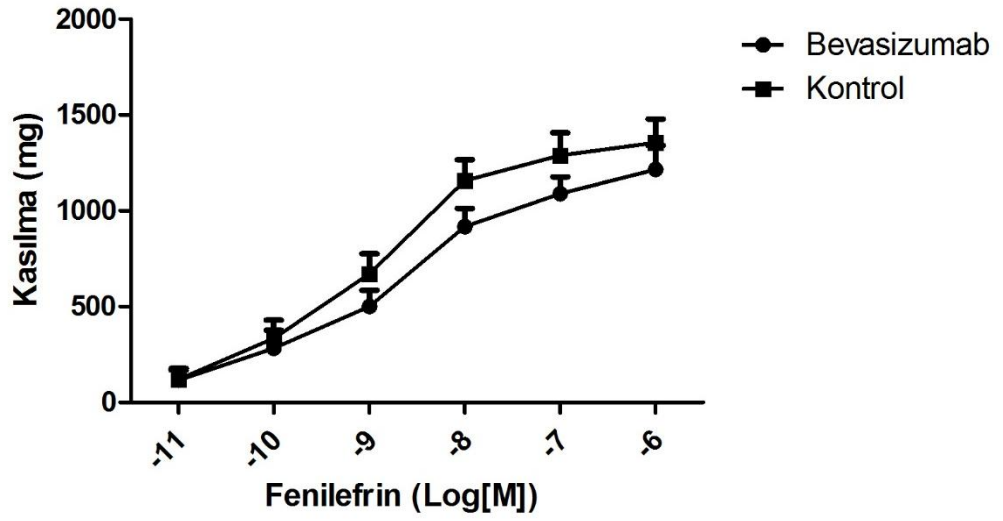
Sıçan kuyruk arterinden elde edilen sistolik kan basıncı değerleri bevasizumab uygulanmış ve başlangıç ölçümlerinde sırasıyla $145 \pm 20 \text{ mmHg}$ ($n=28$) ve $124 \pm 23 \text{ mmHg}$ ($n=28$) olarak kaydedilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.2a. Fenilefrin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)

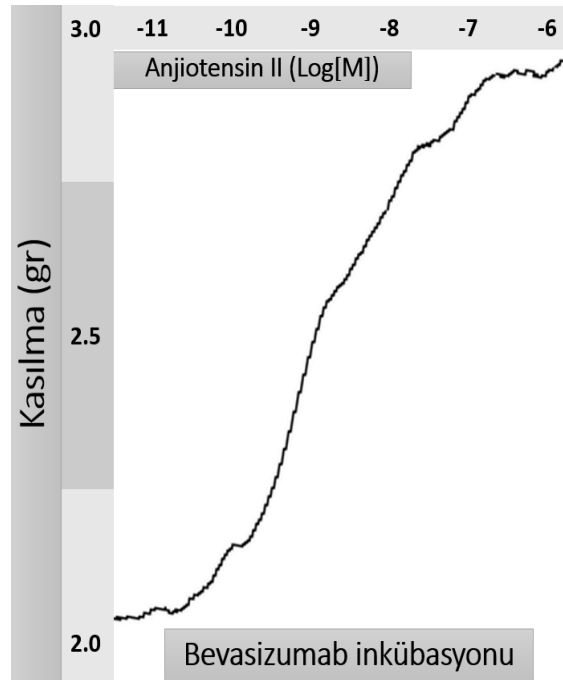


Şekil 4.2b. Fenilefrin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)

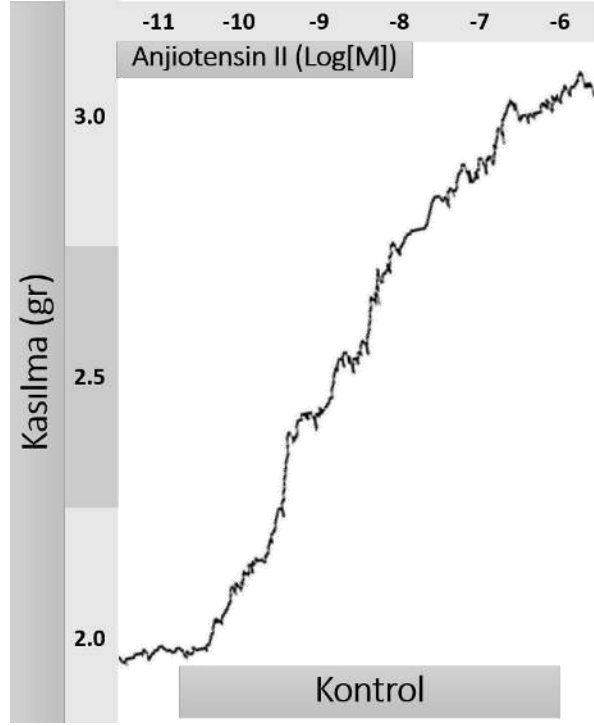


Şekil 4.3. Fenilefrin konsantrasyon yanıt eğrisi

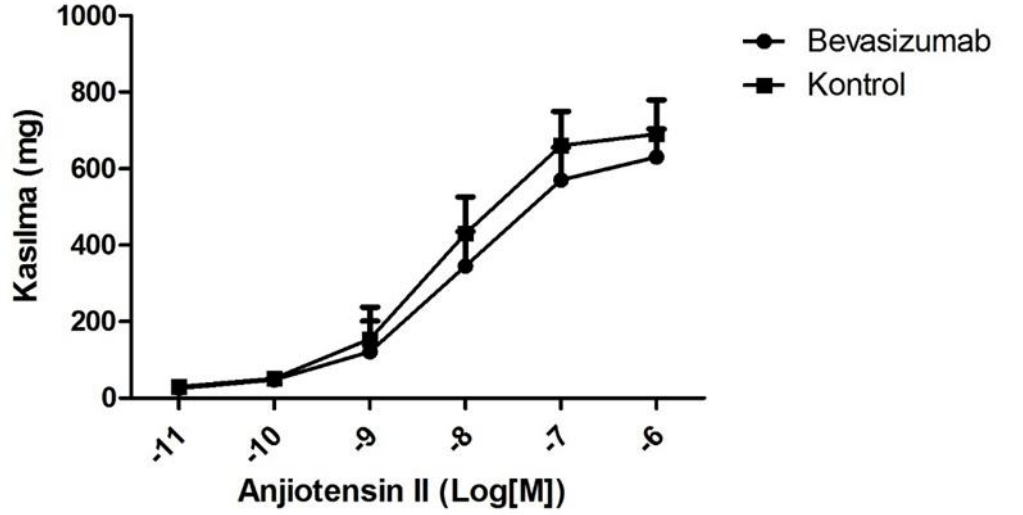
Bevasizumab uygulanan grup ile kontrol grubu damar preparatlarına kümülatif olarak uygulanan fenilefrinle oluşan fenilefrin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab (n=9) ve kontrol (n=9) grupları için pD_2 değerleri 8.73 ± 0.45 ve 8.43 ± 0.38 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla 1240 ± 110 mg ve 1480 ± 140 mg olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.4a. Anjiyotensin II konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)



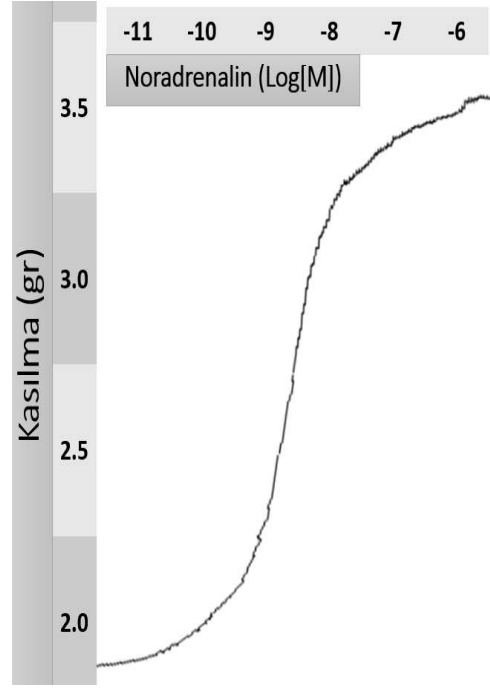
Şekil 4.4b. Anjiyotensin II konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)



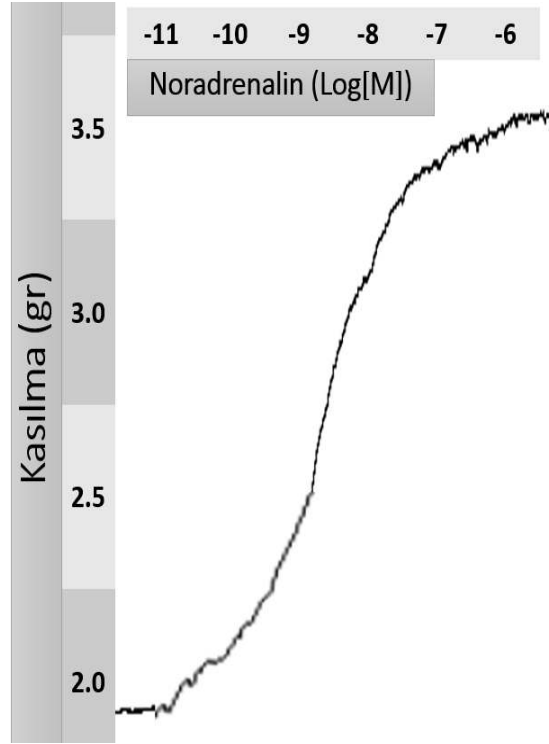
Şekil 4.5. Anjiyotensin II konsantrasyon-yanıt eğrisi

Bevasizumab uygulanan grup ile kontrol grubu damar preparatlarına kümülatif olarak uygulanan anjiyotensin II ile oluşan anjiyotensin II konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab (n=9) ve kontrol (n=9) grupları için pD_2 değerleri 8.54 ± 0.67 ve 8.22 ± 0.54 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla 630 ± 90 mg

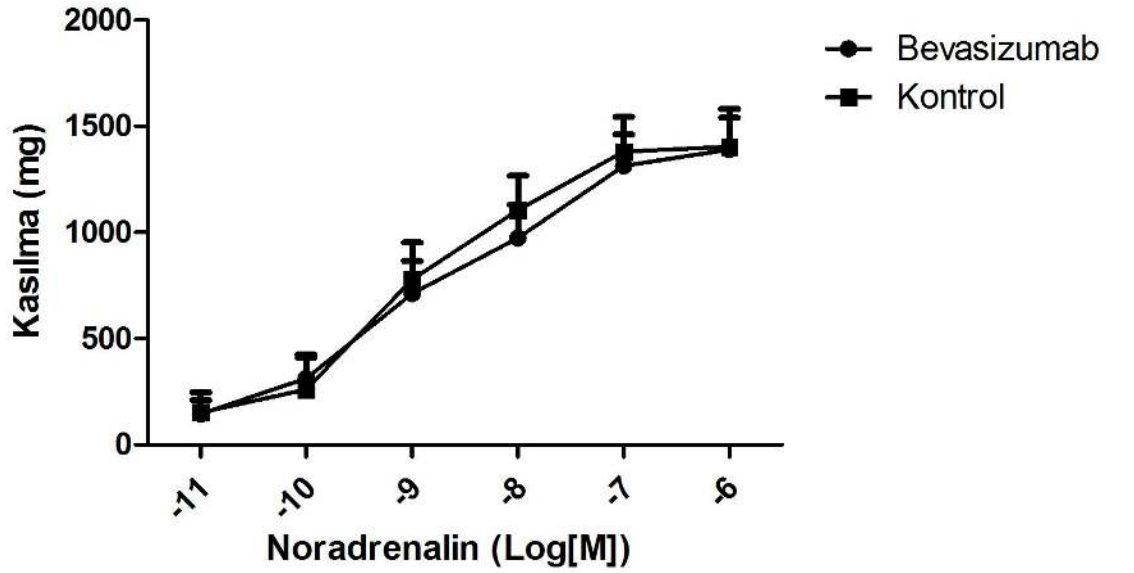
ve 710 ± 110 mg olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.6a. Noradrenalin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)



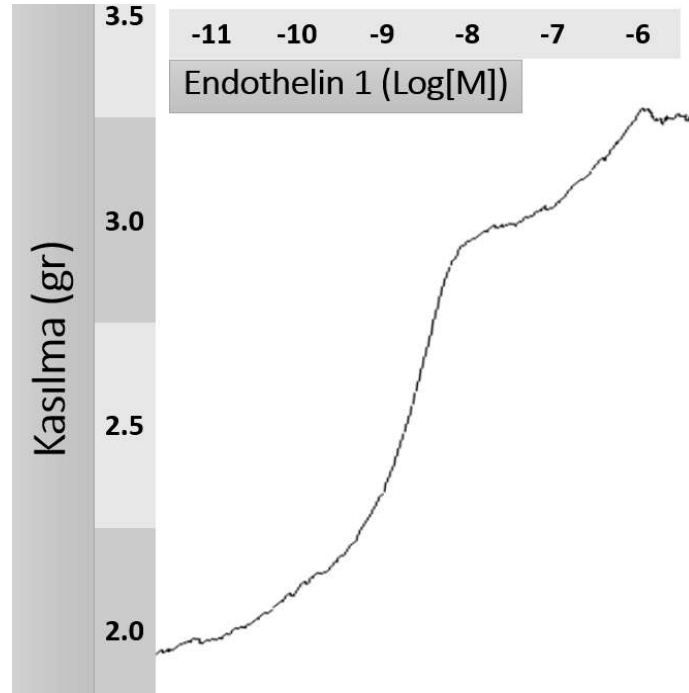
Şekil 4.6b. Noradrenalin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)



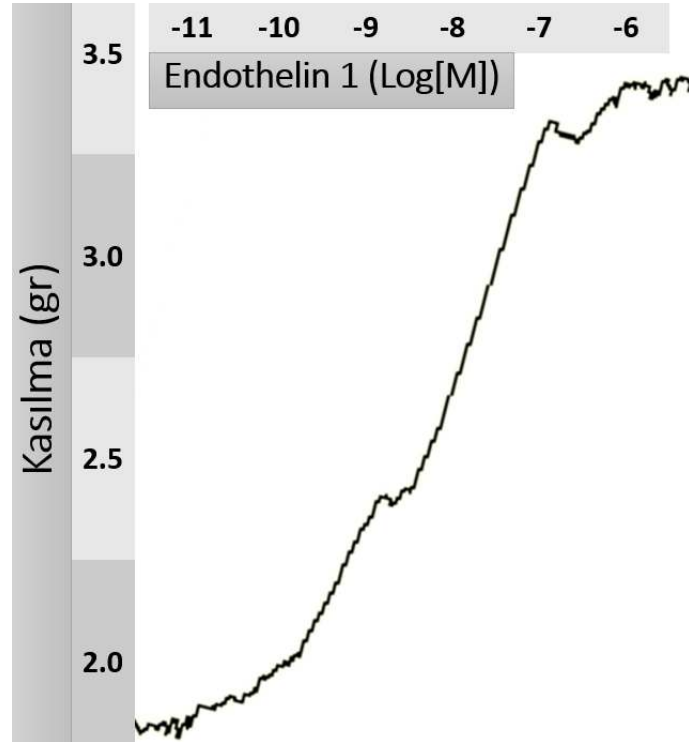
Şekil 4.7. Noradrenalin konsantrasyon-yanıt eğrisi

Bevasizumab uygulanan grup ile kontrol grubu damar preparatlarına kümülatif olarak uygulanan noradrenalin ile oluşan noradrenalin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 8.10 ± 0.56 ve 8.02 ± 0.45 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla 1390 ± 120 mg ve 1410 ± 140

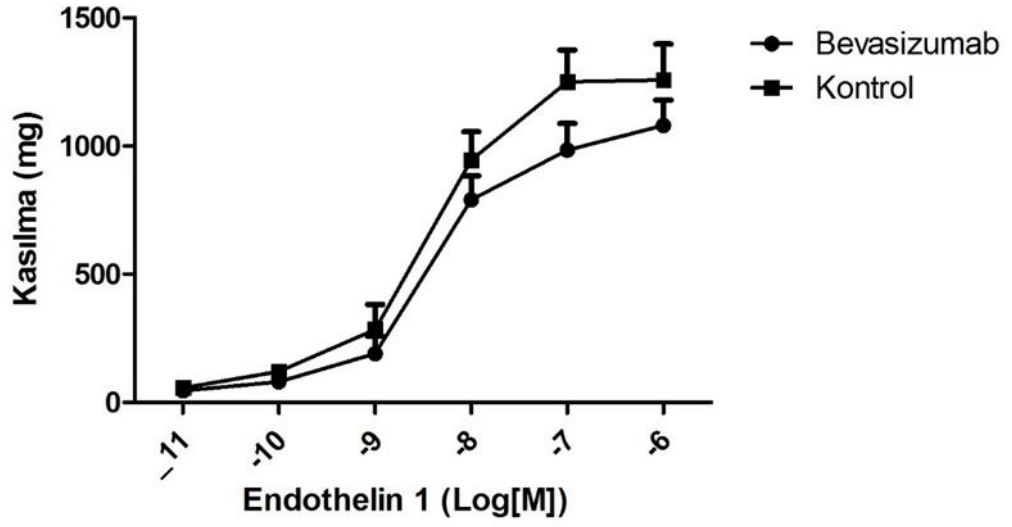
mg olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.8a. Endotelin 1 konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)

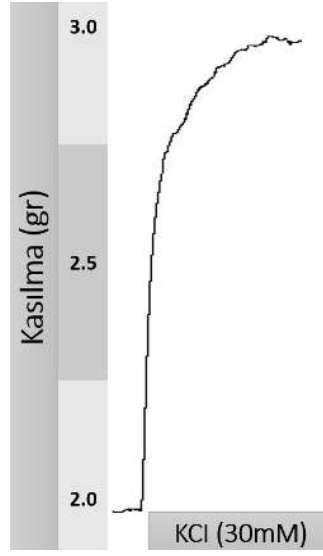


Şekil 4.8b. Endotelin 1 konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)

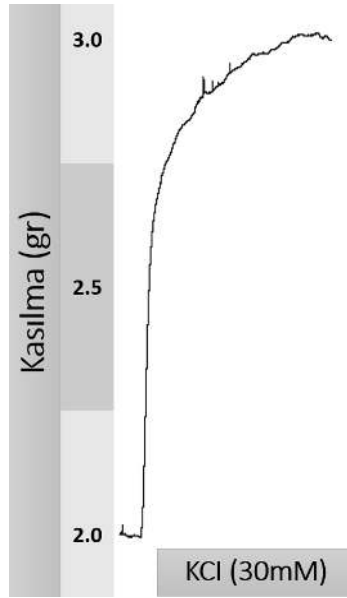


Şekil 4.9. Endotelin I konsantrasyon-yanıt eğrisi

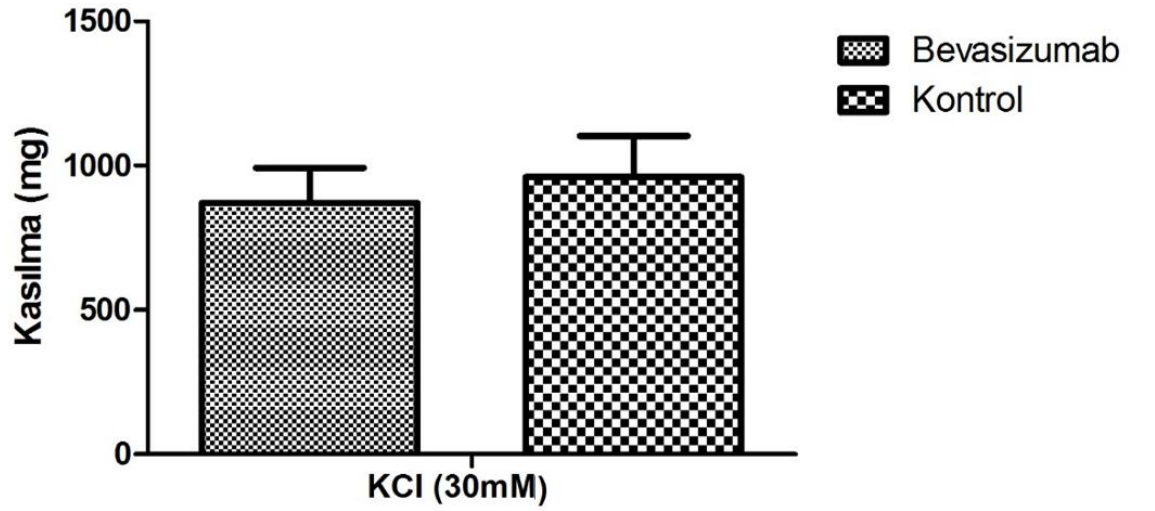
Bevasizumab uygulanan grup ile kontrol grubu damar preparatlarına kümülatif olarak uygulanan endotelin 1 ile oluşan endotelin 1 konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab (n=9) ve kontrol (n=9) grupları için pD_2 değerleri 8.62 ± 0.45 ve 8.52 ± 0.47 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla 1120 ± 100 mg ve 1430 ± 120 mg olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.10a. 30 mM KCl ile kasılma yanıt trasesi (Bevasizumab)



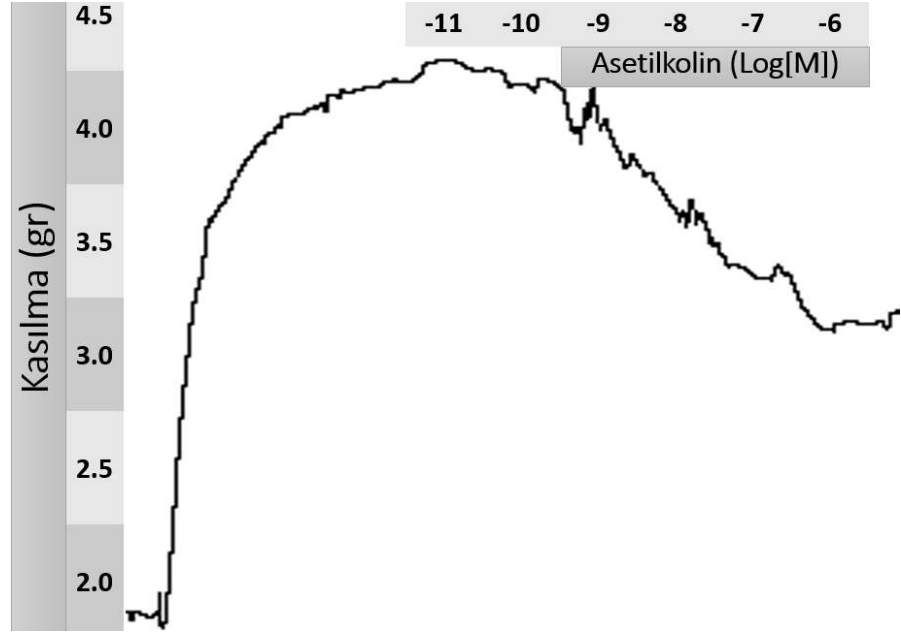
Şekil 4.10b. 30 mM KCl ile kasılma yanıt trasesi (Kontrol)



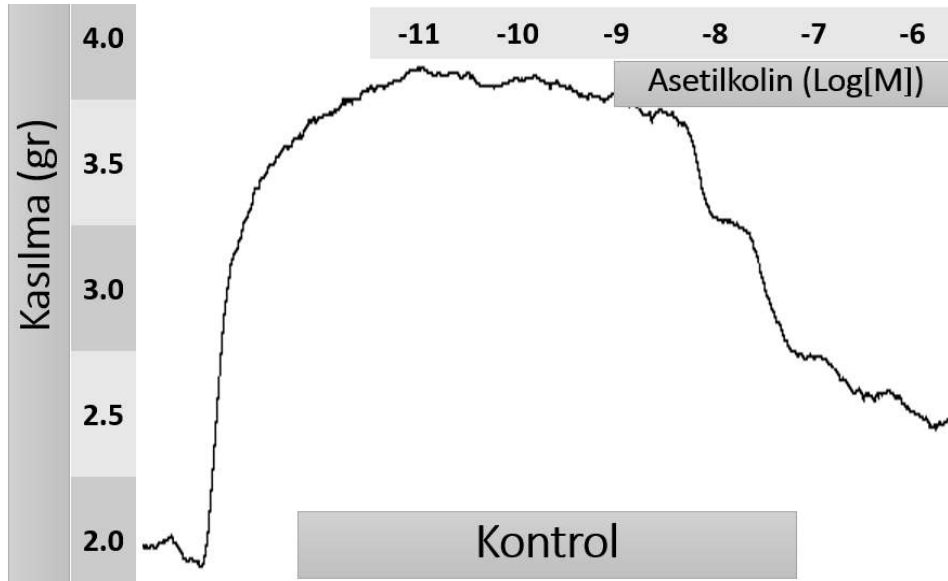
Şekil 4.11. 30 mM KCl ile kasılma yanıtları

Bevasizumab uygulanan grup ile kontrol grubuna uygulanan 30 mM KCl ile oluşan kasılma yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab (n=6) ve kontrol (n=6) gruplarının E_{max} değerleri sırasıyla 850 ± 240 mg ve 920 ± 320 mg olarak bulunmuştur. Gruplar arasında E_{max} değerleri açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

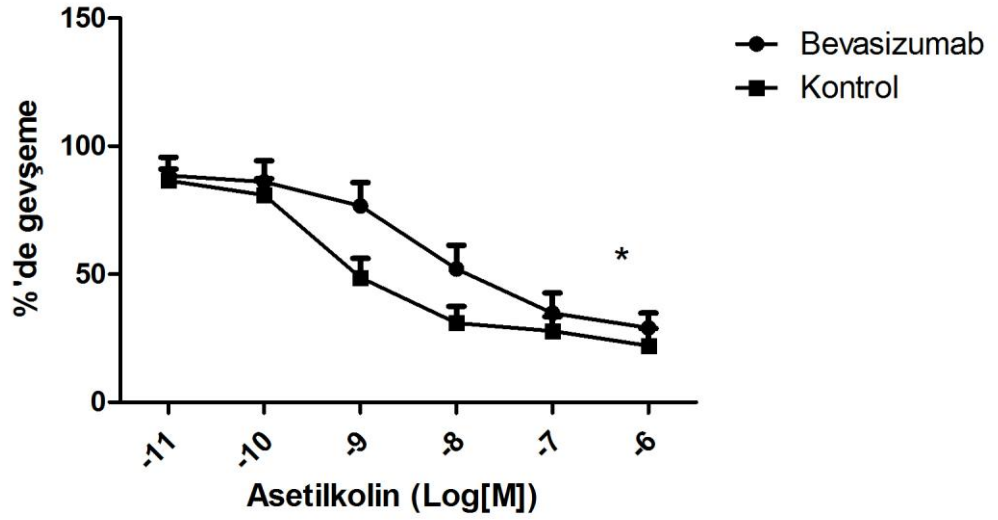
Bevasizumab uygulanmış sıçanlardan alınıp asılan abdominal aorta halkalarında farklı mekanizmalarla oluşturulan kasılma yanıtları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır.



Şekil 4.12a. Asetilkolin konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)

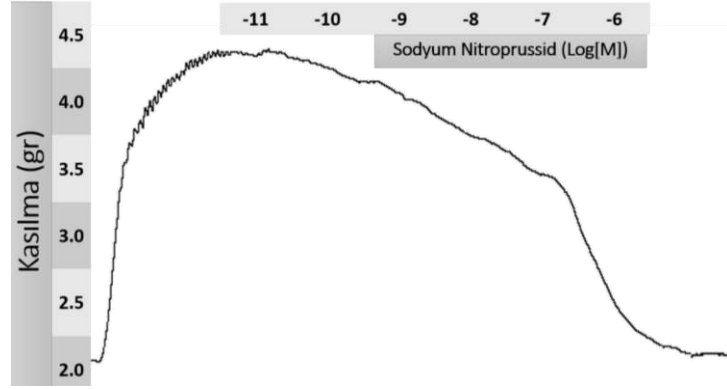


Şekil 4.12b. Asetilkolin konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)

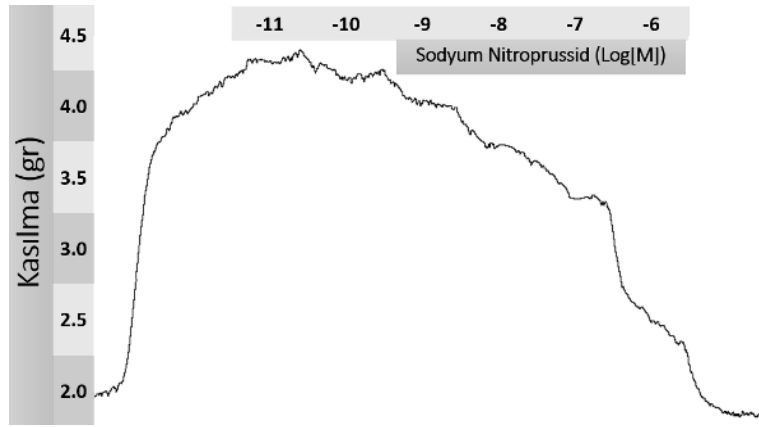


Şekil 4.13. Asetilkolin Konsantrasyon-Yanıt Eğrisi

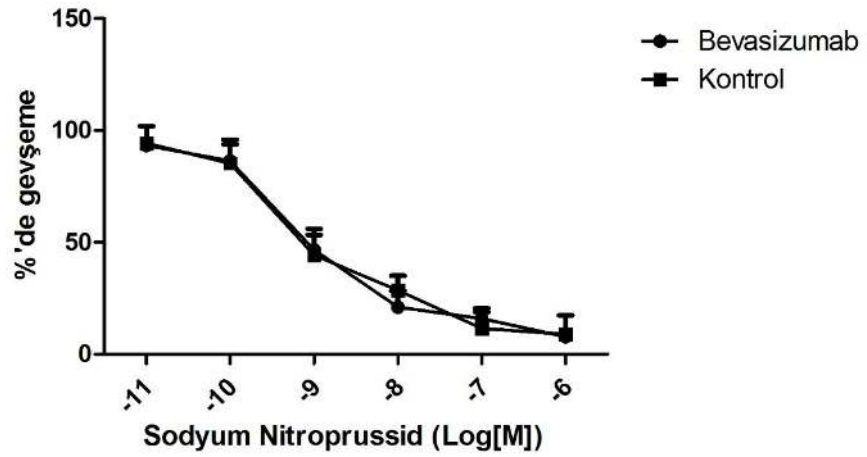
Damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile önceden kastırılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki Bevasizumab (n=9) ile kontrol (n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 8.32 ± 0.43 ve 8.62 ± 0.30 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%72 \pm 08$ ve $\%77 \pm 12$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.05$). E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.14a. Sodyum Nitroprussid konsantrasyon yanıt trasesi (Bevasizumab)

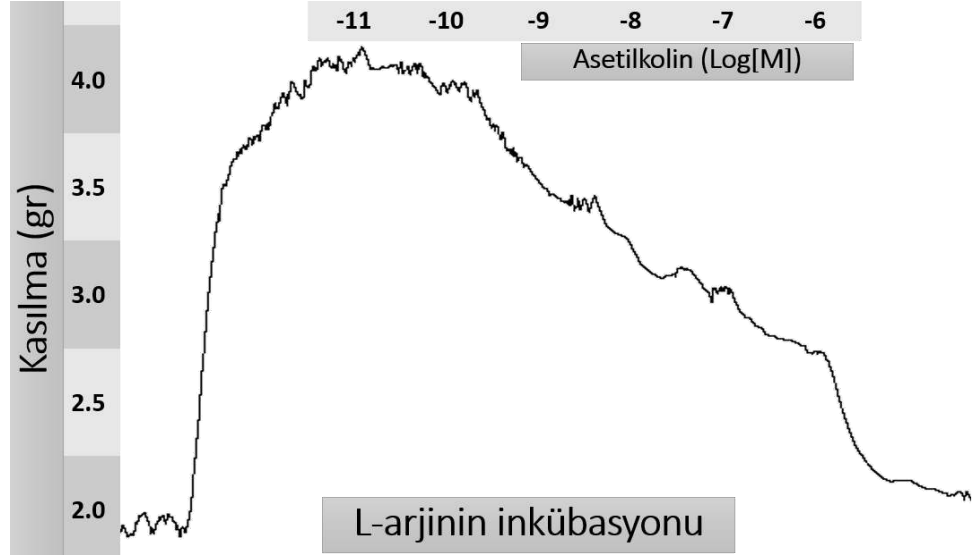


Şekil 4.14b. Sodyum nitroprussid konsantrasyon yanıt trasesi (Kontrol)

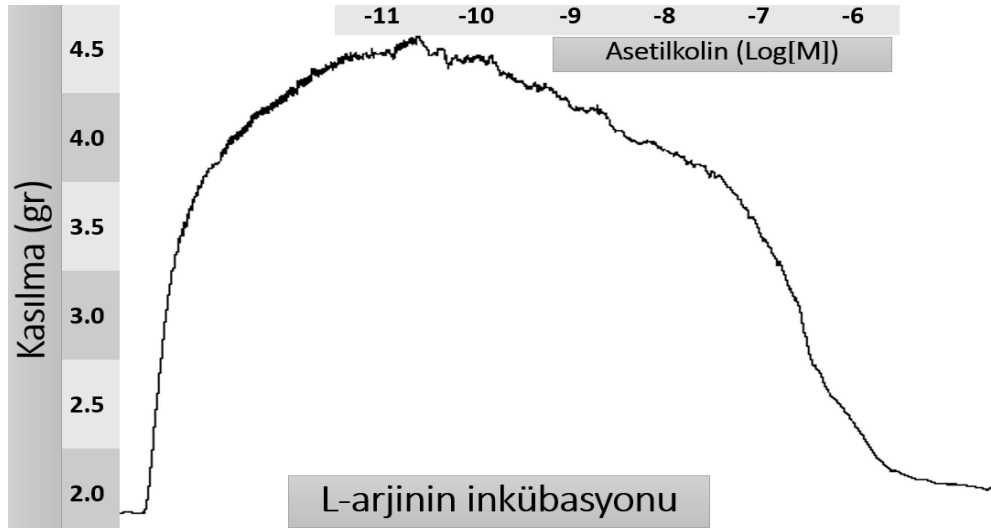


Şekil 4.15. Sodyum Nitroprussid konsantrasyon-yanıt eğrisi

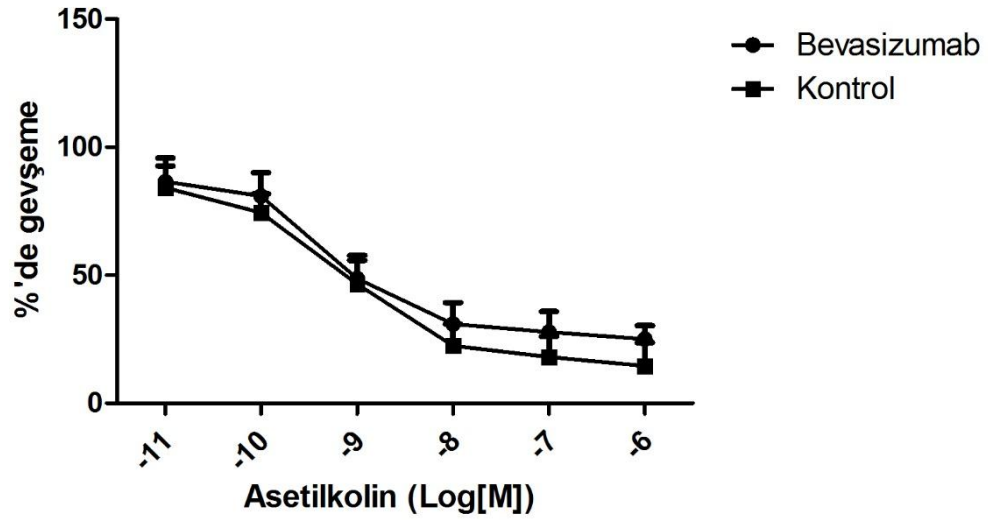
Damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki bevasizumab ile kontrol grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak sodyum nitroprusid uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan sodyum nitroprusid konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab (n=9) ve kontrol (n=9) grupları için pD_2 değerleri 9.11 ± 0.36 ve 9.05 ± 0.48 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%96 \pm 02$ ve $\%95 \pm 03$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.16a. L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)

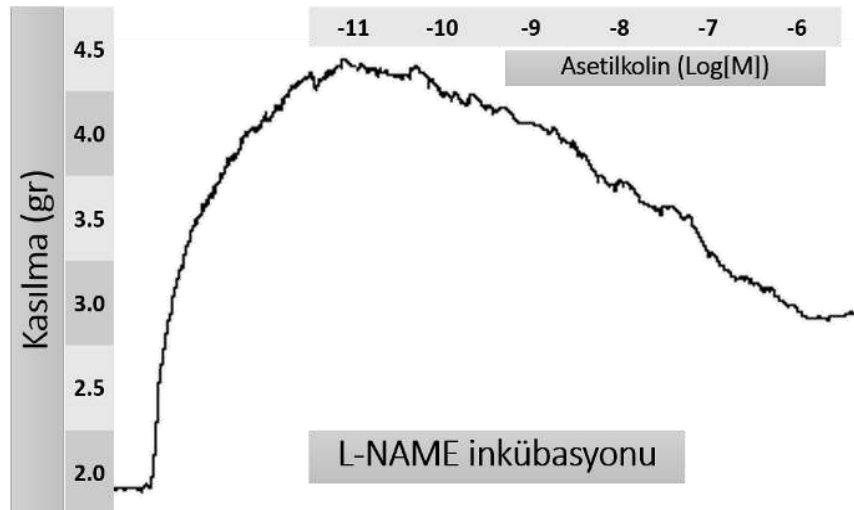


Şekil 4.16b. L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)

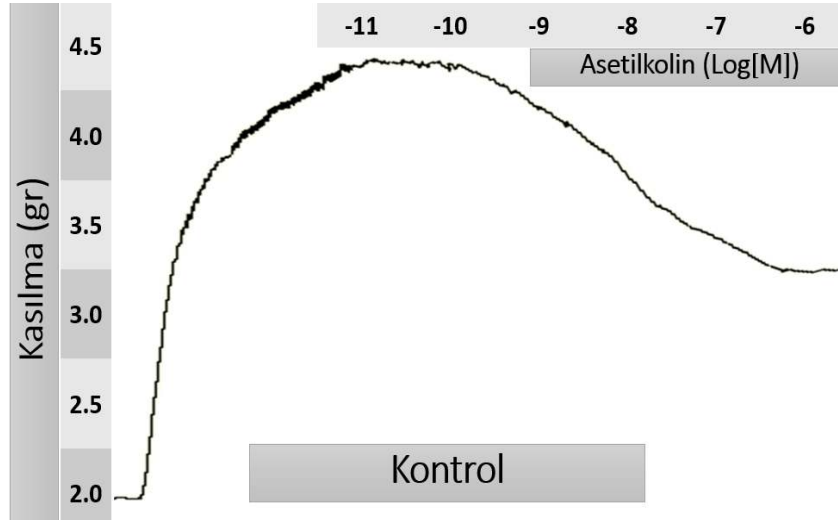


Şekil 4.17. L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi

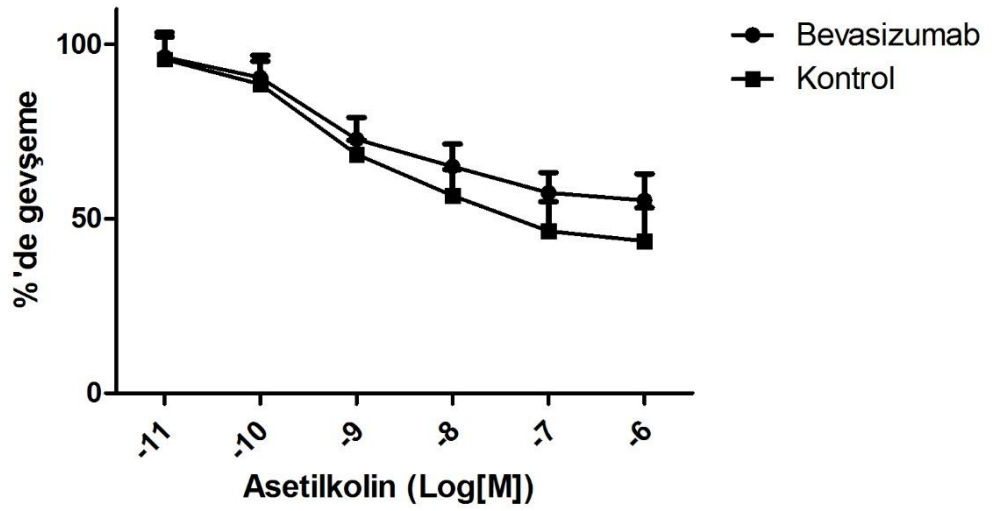
L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki bevasizumab (n=9) ile kontrol (n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 9.12 ± 0.45 ve 9.22 ± 0.30 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%78 \pm 10$ ve $\%85 \pm 13$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.18a. L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)



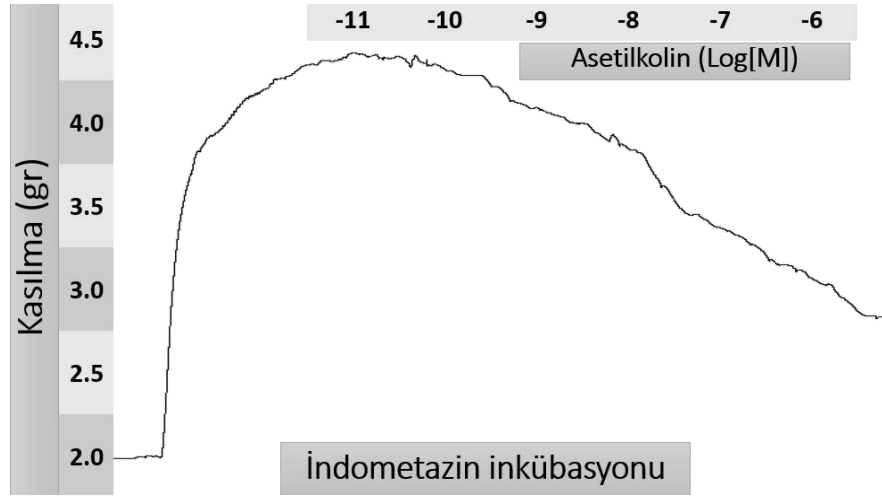
Şekil 4.18b. L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)



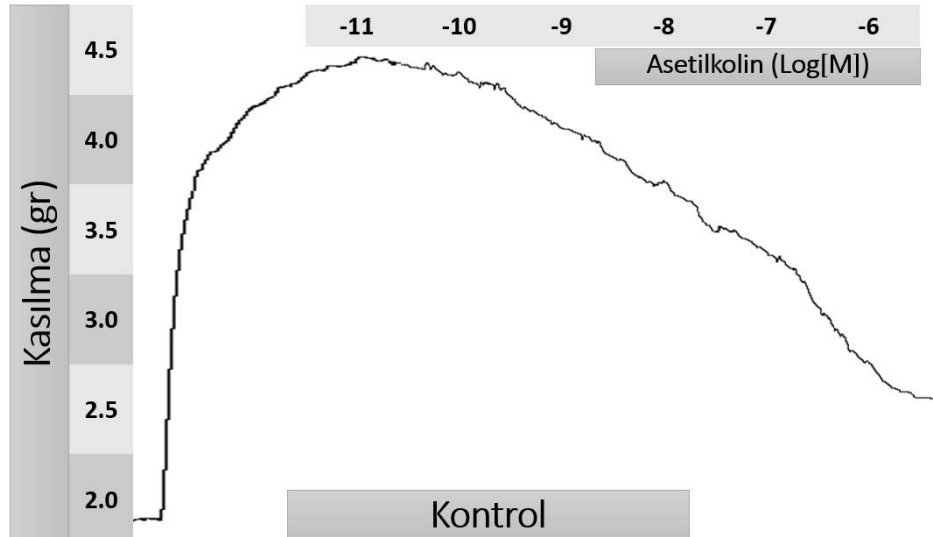
Şekil 4.19. L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi

L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki

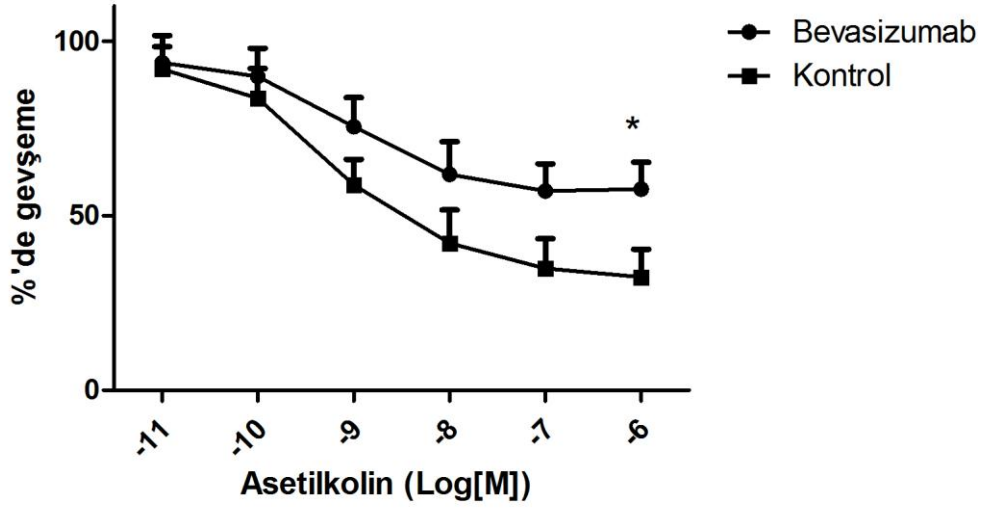
bevasizumab (n=9) ile kontrol (n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 9.03 ± 0.39 ve 9.12 ± 0.34 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%48 \pm 08$ ve $\%56 \pm 10$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.20a. İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)

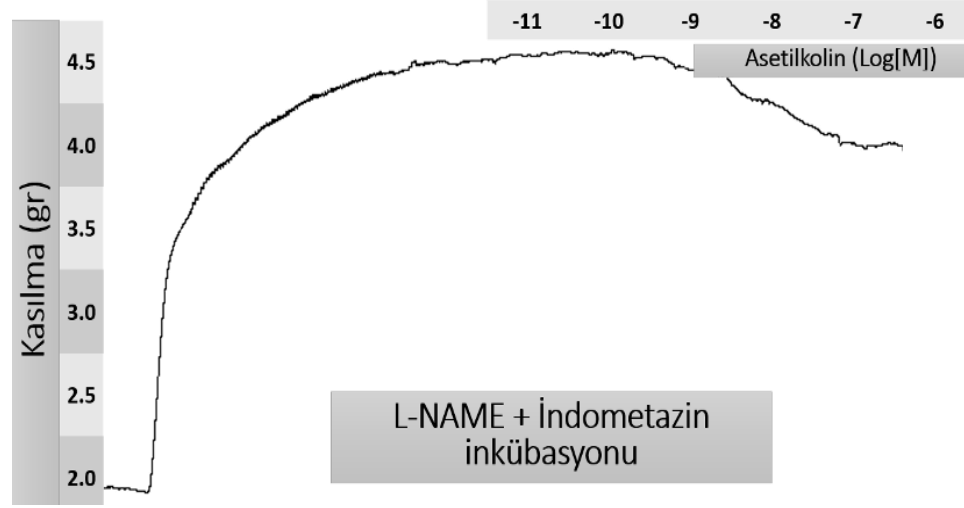


Şekil 4.20b. İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)

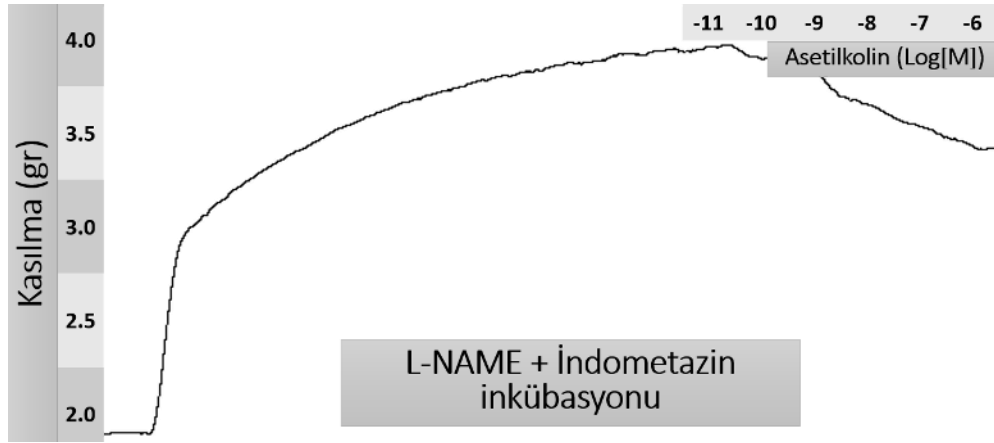


Şekil 4.21. İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi

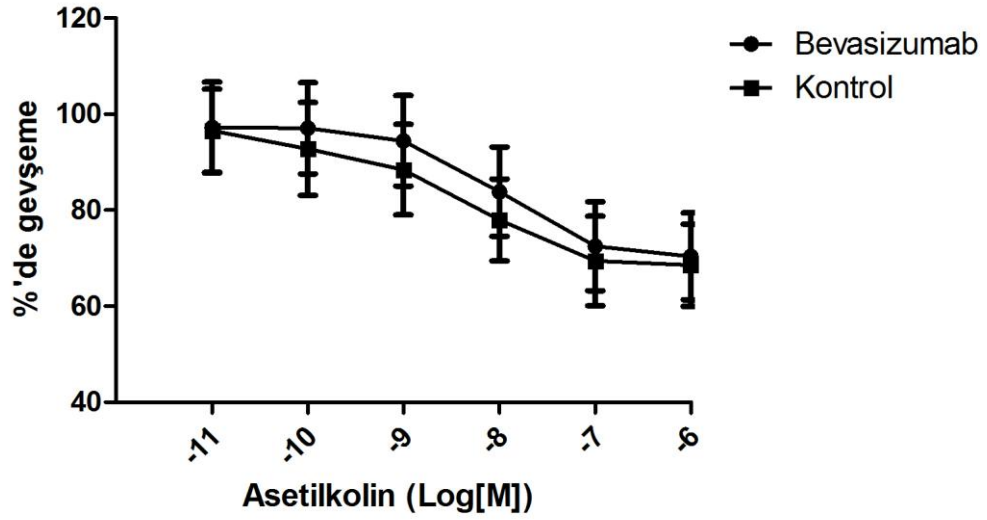
İndometazin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki Bevasizumab (n=9) ile kontrol (n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 8.94 ± 0.33 ve 9.41 ± 0.46 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%40 \pm 08$ ve $\%71 \pm 11$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.22a. İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi

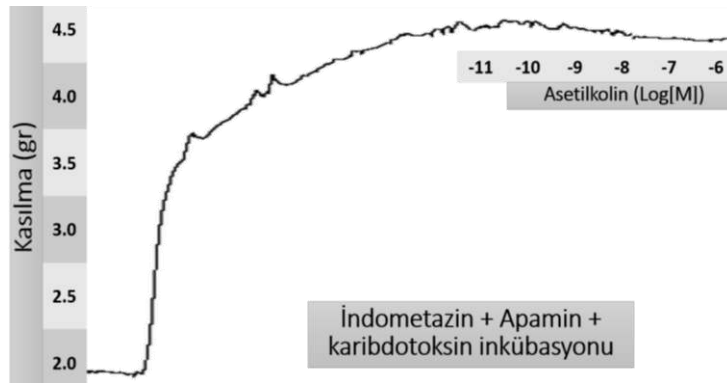


Şekil 4.22b. İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi

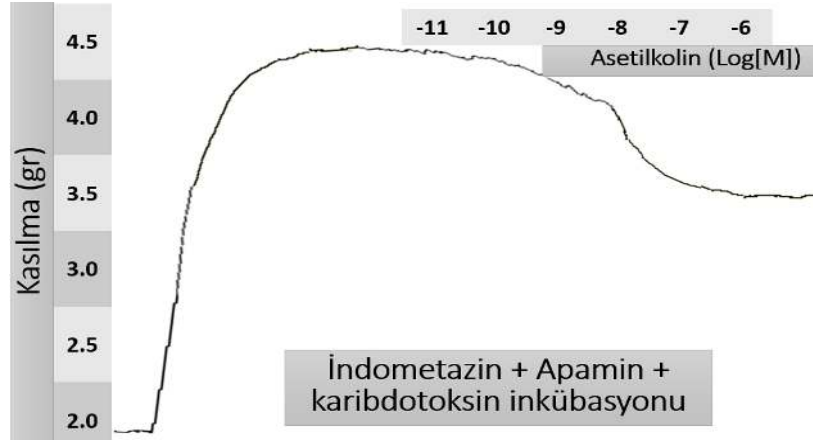


Şekil 4.23. İndometazin (10^{-5} M) ve L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi

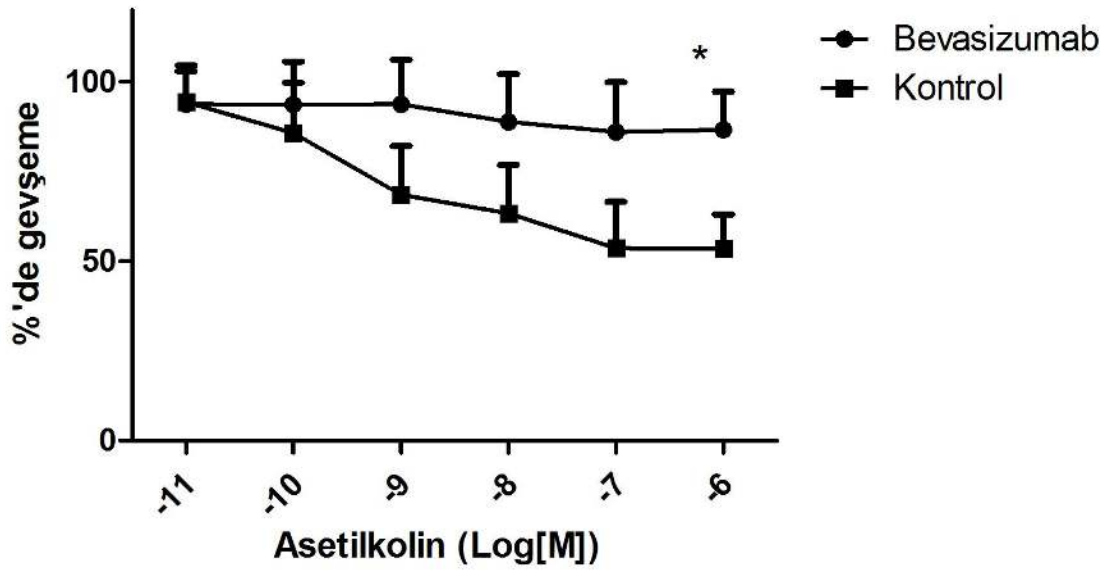
İndometazin (10^{-5} M) ile L-NAME (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki bevasizumab (n=9) ile kontrol (n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 8.12 ± 0.35 ve 8.32 ± 0.45 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%28 \pm 07$ ve $\%30 \pm 05$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel bir anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.24a. İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Bevasizumab)



Şekil 4.24b. İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt trasesi (Kontrol)



Şekil 4.25. İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası asetilkolin konsantrasyon-yanıt eğrisi

İndometazin (10^{-5} M)+ Karibdotoksin (10^{-7} M)+Apamin (10^{-7} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları 10^{-6} M konsantrasyonda fenilefrin ile kasılıp, platoya gelmeleri beklenmiştir. Platodaki bevasizumab (n=9) ile kontrol

(n=9) grubundan damar preparatlarına kümülatif olarak asetilkolin uygulanıp gevşeme yanıtları alınmıştır. Oluşan asetilkolin konsantrasyon yanıt grafiğinde sırasıyla bevasizumab ve kontrol grupları için pD_2 değerleri 7.43 ± 0.45 ve 8.32 ± 0.52 olarak bulunmuştur. E_{max} değerleri de sırasıyla $\%09 \pm 04$ ve $\%42 \pm 12$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında pD_2 ve E_{max} açısından istatistiksel anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Bevasizumab gibi anti-VEGF ajanların, kanser ve gözde maküler dejenerasyon gibi durumların tedavisi için kullanımı sırasında hipertansiyon gelişimi görülebilmektedir. Beklenileceği gibi damar anjiyogenezinin inhibisyonu hipertansiyona neden olabilir (26-32). Yine de ilaca bağlı bazı hastalarda hipertansiyon gelişirken, hastaların daha büyük kısmında ise hipertansiyon gelişmediği görülmektedir. Bevasizumab kullanımı sırasında görülen hipertansiyon insidansının değerlendirildiği bir meta-analizde 15 mg/kg bevasizumab kullanımıyla ilk dozdan 4-6 hafta sonra hastaların ortalama %22'de (%17.6-36) hipertansiyon geliştiği bildirilmiştir. Oluşan tansiyon yükselmesi ilaç kesildikten bir süre sonra tersine dönmüştür (33,34). Diğer bir çalışmada ise 2 hafta gibi kısa süreli uygulanan bevasizumabın endotel kökenli vazodilatasyonu değiştirmemektedir (35). Sonuç olarak bu tür ilaçların kullanımı sırasında çeşitli faktörlere bağlı olarak hipertansiyon görülmekte veya görülmemektedir. Anti-VEGF'lerin lokal kısa süreli kullanımında ise sonuç daha nettir. İnsanlar üzerinde yapılan bir çalışmada lokal VEGF uygulanmasının deri kan akımını artırırken, anti-VEGF uygulanmasının ise azalttığı gösterilmiştir (36). Anti-VEGF NO aracılı damar gevşemesini azaltmaktadır (35). Buna paralel bir şekilde diğer bir çalışmada kanser hastalarında bevasizumabın NO yolağını baskılayarak deride damar yoğunluğu ve kan akımını azalttığı gösterilmiştir (37). Çalışmamızda ise sıçan kuyruk arterinden elde edilen sistolik kan basıncı değerleri başlangıç ve bevasizumab uygulandıktan sonraki ölçümlerinde sırasıyla 124 ± 23 mmHg (n=28) ve 145 ± 20 mmHg (n=28) olarak kaydedilmiştir. İlaç uygulanan sıçanların 15'inde kan basıncında artış görülürken, kontrol grubunda 8 sıçanda kan basıncında artış görülmüştür. Yine de gruplar sistolik kan basıncı artışı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Hayvanların bir kısmında tansiyon yükselirken, diğerlerinde yükselmemesi kanser tedavisi alan insanların bir kısmında tansiyon artışının görülmesiyle benzerdir. Anlaşılabileceği gibi hipertansiyon oluşumu ile ilgili veriler çok net değildir. Antianjiyogenik ilaç kullanımına bağlı oluşan hipertansiyonda nörohumoral yollar ve sıvı volüm artışı bir faktör gibi görünmemektedir (38). Bu da yapısal değişikliklerin, vasküler fonksiyon değişimlerinin bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tür ilaçlarla hipertansiyon gelişimi ile ilgili farklı teoriler bulunmaktadır. Bunlardan ilkinde NO ve/veya prostasiklin üretiminde azalma ve/veya yıkımında artış olabileceğine ilişkindir (39). Bu teorinin diğer bir kısmını da rezistans damar miktarının anti-VEGF kullanımı nedeniyle düşüşünün de hipertansiyon oluşumuna katkıda bulunuyor olabileceğine ilişkindir (40). İkinci teori böbrek yetmezliğine ilişkindir. Bu teori nefronun glomerüler bölgesindeki podosit ve endotel hücrelerinin glomerüler fonksiyon için gerekli olduklarını ve bu hücrelerin olgunlaşması için VEGF'ye ihtiyaç duyduklarını, bu nedenle VEGF blokajının glomerüler skleroza, proteinüriye neden olabileceği ve sonuç olarak hipertansiyon ve böbrek yetmezliği gelişeceğini öne sürmektedir (41). Son olarak pre-eklampsi benzeri teori vardır. Pre-eklampside soluble VEGFR1 (sFLT1) artışı olmaktadır. sFLT1 VEGF yolağını bloke edip, gebede hipertansiyona neden olur. Teori bevasizumab gibi anti-VEGF'ler de

benzer bir şekilde hipertansiyon oluşturduğunu ileri sürmektedir (42). Yapılan bir çalışmada ise bevasizumab uygulanan kanserli hastalarda plazma renin, aldosteron ve katekolamin düzeylerinin artmadığı gösterilmiştir (43). Renin ve aldosteron artışının olmaması böbrek yetmezliği geliştiği teorisine ters düşmektedir.

Bu çalışmamızda, ilk teorisinin geçerliliğini de test etmeği amaçlamanın yanında bevasizumabın damar fizyolojisine etkilerine araştırması diğer bir hedefimizdi. Damar fizyolojisi içinde öncelikle damar kasılma yanıtları üzerine bevasizumabın etkisi incelendiğinde: Çalışmada fenilefrin, anjiyotensin II, KCI, endotelin 1 ve noradrenalin gibi çeşitli kasıcı ajanlarla, anti-VEGF'nin kasılma mekanizmaları üzerinden etkilerini inceledik. Farklı farklı mekanizmalarla oluşturduğumuz kasılma yanıtlarında ne pD_2 ne de E_{max} değerleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmadı. Bu sonuçlara bakarak bir anti-VEGF olan bevasizumab'ın damar kasıcı mekanizmalar üzerinde önemli bir farklılık oluşturmadığını düşünebiliriz. Damar fizyolojisinde ikinci nokta gevşeme yanıtları üzerindeki etkiydi.

VEGF endotel fonksiyonlarını değiştirmektedir. Bunlardan biri eNOS aktivitesini artırarak NO miktarını artırıp vazodilatör etki oluşturmaktadır (44,45). Diğerisi ise prostasiklin üretiminde olası bir artıştır (39). Endotel fonksiyon bozukluğu homeostatik dengeyi bozup; lökositlerin endotele yapışmasına, trombosit aktivasyonunda artışa, mitogeneze, prooksidasyon ve ateroskleroz oluşumuna neden olur. Sonuç olarak mortalite ve morbiditede artışa neden olur (46).

Çalışmada Fe-ACh konsantrasyon yanıt eğrilerinin E_{max} değerlerinin değişmemesi fakat pD_2 değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı olması uygulanan ACh nedeniyle üretilen NO miktarının daha düşük veya NO yıkımının daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Eğer NO yıkımında farklılık varsa Fe-SNP yanıtlarının da farklı çıkması gerekir. Çalışmada ise Fe-SNP yanıt eğrilerinin E_{max} ve pD_2 değerlerinin istatistiksel olarak farklı olmaması bu olasılığı azaltmıştır. Yine endotelin gevşeme fonksiyonundaki değişiklikleri incelemek için L-arjinin (10^{-5} M) ile 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları Fe-ACh konsantrasyon yanıt eğrileri alınmıştı. E_{max} ve pD_2 değerlerine baktığımızda istatistiksel olarak bir farklılık oluşmamıştır. Dışardan L-arjinin verilmesiyle ACh'ye bağlı gevşeme yanıtlarının düzelmesi birkaç olasılığı düşündürmektedir. Anti-VEGF varlığında NO tüketimi artışına bağlı prekürsörü olan L-arjinin azalmakta bunun sonucu olarak üretilen NO miktarı sınırlı olmaktadır. Bir diğeri ise anti-VEGF bir şekilde NOS aktivitesini baskılamaktadır. Bu ikinci olasılığı Youn ve ark.'nın (47) VEGF'nin eNOS aktivitesini fosfoinositid 3-kinaz/Akt bağımlı eNOS fosforilasyonunu artırarak oluşturduğunu gösterdikleri çalışma desteklemektedir. Anti-VEGF varlığında vazodilatasyonun bozulmasında diğer bir olasılık NO dışında prostaglandinler ve EDHF olabilir. Bu yolların olası etkisi için L-NAME (10^{-5} M) veya indometazin (10^{-5} M) veya L-NAME (10^{-5} M)+indometazin (10^{-5} M) veya apamin (10^{-7} M)+Karibdotoksin (10^{-7} M)+indometazin (10^{-5} M) ile ayrı ayrı 20 dakika inkübasyon sonrası damar halkaları fenilefrinle kasılıp asetilkolinin kümülatif uygulanmasıyla gevşeme yanıtları alındı.

L-NAME varlığında gevşeme yanıtlarının benzer şekilde azalması olasılıkla anti-VEGF'nin yalnızca NO yolağını etkilediğini düşündürdü. İndometazin ile

inkübasyon sonrası elde edilen gevşeme yanıtları azalmıştı fakat bevasizumab uygulanmış grupta gevşeme yanıtlarının daha da fazla azalmış olması, inkübasyona indometazinle birlikte L-NAME eklenmesi sonrasında alınan Fe-ACh konsantrasyon yanıt eğrilerinin anlamlı bir farklılık göstermemesi anti-VEGF'lerin olası hipertansiyon oluşturma mekanizmaları arasında sayılan prostaglandin yolağının etkisinin fazla olmadığını düşündürmektedir.

Son olarak EDHF blokoja için apamin+karibdotoksin ile bir siklooksijenaz inhibitörü indometazin ile birlikte inkübasyon sonrasında alınan Fe-ACh yanıtlarına bakınca kontrol grubu 42 ± 12 gevşemeye devam ederken, bevasizumab grubunun yalnızca 9 ± 4 oranında gevşemesi anti-VEGF varlığında büyük oranda NO yolağının bozulduğunu düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Sonuç olarak; bevasizumab gibi kanser veya maküler dejenerasyon durumlarında kullanılan anti-VEGF ajanların kullanımına bağılı olarak damar yanıtlarında farklılaşma görölmektedir. Damar kasılma yanıtlarında önemli bir değışiklik olmazken, gevşeme yanıtları bozulmaktadır. Endotel aracılı gevşemede NO, prostaglandin ve EDHF yolakları arasından NO yolağıının etkilendiğı, bu etkinin olasılıkla NOS aktivitesinin değışmesinden kaynaklandığını görölmektedir. Anti-VEGF ajanlarla oluşın hipertansiyonun en azından bir bölümünden NOS aktivitesindeki bu değışimin sorumlu olduğı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Folkman J. Tumour Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Eng J Med* 1971; 285: 1182-6.
2. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-8.
3. Poon RT-P, Fan S-T, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19: 1207-25.
4. Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
5. Nathanson SD. Insights into the Mechanisms of Lymph Node Metastasis. *Cancer* 2003; 98: 413-23.
6. Kerbel R, Folkman J. Clinical Translation of Angiogenesis Inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 727-39.
7. Ross R. Atherosclerosis an Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115-26.
8. HG. Kozian DH. Johnson RC. Differentiation of Endothelial Cell. *Bioessay* 1994; 16: 901.
9. Furchott RF. Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cell in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373- 376
10. Michel et al. Prosective series: Nitric Oxide, Nitric Oxide Syhenthases: Which, Where, How and Why. *J. Clin Invest*, Vol 100 November; 1997: 2146- 2152.
11. Charles et al. Nitric Oxide, A physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine* Volume 120, Isue 3 1994; 227-237.
12. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Rat Arteries. *Nature* 1998; 396: 269-272.
13. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic Acids and Endothelium-Dependent Responses. *Pflugers Arch* 2010; 459: 881-895.
14. Hydrogen Peroxide is an Endothelium-Derived Hyperpolarising Factor in Mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 1521-1530.
15. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD. Pyridoxamine Inhibits Early Renal Disease and Dyslipidemia in the Streptozotocin-Diabetic Rat. *Kidney Int.* 2002;61:939-50.

16. Ferro CJ, Webb D. Endothelial Function and Hypertension. *Drugs*. 1997; 53 Suppl 1: 30-41 Review.
17. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 1988; 332: 411-415
18. Khrbanda RK, Deanfield J. Functions of the Healthy Endothelium. *Coronary Arter Disease* 2001; 12:485-91
19. Anderson TJ. Assessment and Treatment of Endothelial Dysfunction in Humans. *J Am Coll cardiol* 1999; 34:3:631-8
20. Choueiri TK, Mayer EL, Je Y, Rosenberg JE, Nguyen PL, A zzi GR, Bellmunt J, Burstein HJ, Schutz FA. Congestive Heart Failure Risk in Patients with Breast Cancer Treated with Bevacizumab. *J Clin Oncol* 2011; 29:632-638.
21. Rossari J, de Azambuja E, Metzger O, Gennari A, Piccart -Gebhart M, Paesmans M. Bevacizumab Combined with Chemotherapy as First-line Treatment of Metastatic Breast Cancer Patients: A Meta-Analysis Based on Studies Having Randomized 2,695 patients. *Eur J Cancer* 2010; 8: 122-128.
22. Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, Gerber HP, Mil ler K, Kabbinavar F, Bergsland E, Ngai J, Holmgren E, Wang J, Hurwitz H. Arterial Thromboembolic Events in Patients with Metastatic Carcinoma Treated with Chemotherapy and Bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1232-1239.
23. Miles DW, Chan A, Dirix LY, Cortés J, Pivot X, Tomczak P, Delozier T, Sohn JH, Provencher L, Puglisi F, Harbeck N, Steger GG, Schneeweiss A, Wardley AM, Chlistalla A, Romieu G: Phase III Study of Bevacizumab Plus Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel For The Fi Rst-Line Treatment Of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:3239-3247.
24. Miller KD, O'Neill A, Perez EA, Seidman AD, Sledge GW: Phase II Feasibilit Trial Incorporating Bevacizumab Into Dose-Dense Doxorubicin And Cyclophosphamide Followed By Paclitaxel In Patients With Lymph Nodepositive Breast Cancer: A Trial Of The Eastern Cooperative Oncology Group (E2104). *J Clin Oncol* 2008; 26: 520.
25. S, Godfrey L, Nulsen B, Chen C, Steingart R, Rugo H, Norton L, Winer E, Hudis CA, Dang CT: Dose-dense Adjuvan Doxorubicin and Cyclophosphamide is not Associated with Frequent Short-Term Changes in Left Ventricular Ejection Fraction. *J Clin Oncol* 2009; 27:6117-6123.
26. Yang JC, Haworth L, Sherry RM et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; 349: 427–434.
27. Zakarija A, Soff G. Update on angiogenesis inhibitors. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 578–583.

28. Sane DC, Anton L, Brosnihan B. Angiogenic growth factors and hypertension. *Angiogenesis* 2004; 7: 193–201.
29. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335–2341.
30. Miller KD, Chap LI, Holmes FA et al. Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 792–799.
31. Thomas AL, Morgan B, Dreys J et al. Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK222584. *Semin Oncol* 2003; 30 (Suppl 6): 32–38.
32. Fiedler W, Serve H, Dohner H et al. A phase I study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood* 2005; 105: 986–993.
33. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2001 Feb; 19 (3): 843-50
34. Margolin K, Gordon MS, Holmgren E, et al. Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol* 2001 Feb; 19 (3): 851-6
35. Prisby R, Menezes T, Campbell J et al. Vasodilation to PTH (1-84) in bone arteries is dependent upon the vascular endothelium and is mediated partially via VEGF signaling. *Bone*. 2013 May;54(1):68-75.
36. Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hvid I. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2003;21:335–40.
37. Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, Levy BI, et al. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab. A crucial role for microcirculation. *Ann Oncol*. 2008 May;19(5):927-34.
38. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335–2341.
39. Syrigos KN, Karapanagiotou E, Boura P, Manegold C, Harrington K, et al. Bevacizumab-induced hypertension: pathogenesis and management. *BioDrugs*. 2011 Jun 1;25(3):159-69.

40. Mourad JJ, des Guetz G, Debbabi H, et al. Blood pressure rise following angiogenesis inhibition by bevacizumab: a crucial role for microcirculation. *Ann Oncol* 2008 May; 19 (5): 927-34.
41. Izzedine H, Rixe O, Billemont B, et al. Angiogenesis inhibitor therapies: focus on kidney toxicity and hypertension. *Am J Kidney Dis* 2007 Aug; 50 (2): 203-18.
42. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, et al. 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 Apr; 278 (15): 12605-8
43. Veronese ML, Mosenkis A, Flaherty KT et al. Mechanisms of hypertension associated with BAY 43-9006 treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1363–1369.
44. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J et al. VEGF receptor signaling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 359–371.
45. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2604–9.
46. Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2005; 23: 233–246.
47. Youn JY, Wang T, Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production. *Circ Res* 2009;104: 50–59.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegöl GÜMÜŞ BAŞKAYA, 06.06.1987’de Kayseri’de doğdu. İlköğretimin TED Kayseri Koleji’nde, lise öğrenimini Nuh Mehmet Küçükçalık Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden mezun oldu. 2010-2011 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kemoterapi Ünitesi’nde eczacı olarak çalıştı. 2011-2012 Eğitim Öğretim Yılı Bahar Dönemi’nde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisan eğitimine başladı. 2011 yılından beri Memorial Sağlık Grubu’nda Kemoterapi Ünitesinde eczacı olarak çalışmaktadır.