



UJBCM

International Journal of Basic and Clinical Medicine
Uluslararası Temel ve Klinik Tıp Dergisi

Research Article / Araştırma Makalesi

Anti Vasküler Endotelial Büyüme Faktör Monoklonal Antikoru Bevasizumab'ın Böbrek Fonksiyonları ve Morfolojisi Üzerine Olan Etkileri

Effects of Bevacizumab, an Anti Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody, on Kidney Function and Morphology

Neslihan Soysal Atile¹, Neziha Meydan², Muharrem Balkaya³, İbrahim Meteoğlu⁴, Cengiz Ünsal³, Bülent Bilir⁵

¹Tekirdağ Devlet Hastanesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları, Tekirdağ, Türkiye
²Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Onkoloji BD, ³Veterinerlik Fakültesi, Fizyoloji AD, ⁴Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Aydın, Türkiye
⁵Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Tekirdağ, Türkiye

Özet

Amaç

İnsan VEGF monoklonal antikoru bevasizumab kullanarak, bu tedavinin böbrek üzerine olan yan etkilerini gözlemleyebileceğimiz deneysel bir sıçan modeli oluşturmak ve bevasizumab'ın sıçan böbreği üzerine olan etkilerini değerlendirmektir.

Materyal ve Metot

Otuzaltı adet erişkin dişi Wistar albino sıçan "üç günlük" ve "21 günlük" iki ana gruba ayrıldı. Her grup üçe bölündü; iki gruba kuyruk venlerinden intravenöz olarak bevasizumab 10 mg/kg ve 20 mg/kg dozlarında uygulandı, üçüncü gruba kontrol grubu olarak 1 ml/kg serum fizyolojik uygulandı. İlaç verilmesi öncesi, ilaç verilmesinin üçüncü günü ve ilaç verilmesinin 21. günü proteinüriyi saptamak amacıyla 24 saatlik idrarları ve böbrek fonksiyon testleri çalışılmak üzere serumları toplandı. Üçüncü ve 21. gün sıçanlar sakrifiye edilerek böbrekleri patolojik olarak incelendi.

Bulgular

10 mg/kg dozunda bevasizumab uygulanan sıçanlarda üçüncü gün 24 saatlik idrar protein atılımı, kreatinin atılımı ve idrar protein/kreatinin oranlarında anlamlı bir artış olmuş; 21 gün grubunda ise ne 10 mg/kg ne de 20 mg/kg ilaç verilen grupta anlamlı proteinüri artışı gösterilememiştir. Üçüncü gün sakrifiye edilen sıçanlarda bowman kapsül aralığı ve interstisyel inflamasyonun ilaç dozuyla orantılı olarak anlamlı artışı saptanmıştır. 21. gün sakrifiye edilen grubun patolojik değerlendirmesinde ise doz artışıyla korele olarak damar duvarında kalınlaşma gözlenmiştir.

Sonuç

İnsan VEGF monoklonal antikoru bevasizumab kullanarak, bu tedavinin böbrek üzerine olan yan etkilerini gözlemleyebileceğimiz deneysel bir sıçan modeli oluşturmak için 10 mg/kg dozunda üç günlük bevasizumab uygulanmasının uygun olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: İnsan VEGF monoklonal antikoru; bevasizumab; böbrek

Abstract

Aim

To constitute an experimental rat model by using human VEGF monoclonal antibody bevacizumab, for observation of renal side effects of this treatment.

Materials and Methods

Thirty-six adult female Wistar albino rats has been divided as two main groups: "3 days" and "21 days". Each group has been divided in three; bevacizumab 10 mg/kg and 20 mg/kg were administered intravenously from the tail veins of the two subgroups and 1 mg/kg saline was administered to the third subgroup as control. Urine for 24 hours for detection of proteinuria and blood samples for detection of renal functions were collected before, third day and 21st day of the drug administration and rats were sacrificed at third and 21st days for pathological examination of kidneys.

Results

Twenty-four hours urine protein excretion, creatinin excretion and urine protein/creatinin ratio were demonstrated as significantly increased on the third day of the rats administered 10 mg/kg bevacizumab; however, any significant increase of proteinuria couldn't be shown on the 21 days group rats administered neither 10 mg/kg or 20 mg/kg. Pathological examination of rats sacrificed on third day demonstrate the significant increase of bowman capsule gap and interstitial inflammation as correlated with the dosage of the drug. The thickness of vessel wall was observed on the pathological examination of rats sacrificed on 21st day.

Conclusion

It has been shown that bevacizumab administration of 10 mg/kg for three days is proper for constitution of an experimental rat model.

Key words: human VEGF monoclonal antibody; bevacizumab; kidney

Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Sorumlu Yazar: Neslihan Soysal Atile
Tekirdağ Devlet Hastanesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları, Tekirdağ, Türkiye
Tel: 0282-2625355 Dahili:1543
E-posta: soysaln@yahoo.com

Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 18.03.2016
Date Accepted / Kabul Tarihi: 25.03.2016

Giriş

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. Onkolojide; tümör dokusunda gerçekleşen patolojik anjiogenez 1970'lerden itibaren ilgi konusu olmuştur¹. Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve antianjiyogenik tedavide üzerinde en çok durulanı vasküler endotelial büyüme faktörüdür (vascular endothelial growth factor=VEGF).

VEGF homodimerik, heparin-binding glikoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGF-A anjiogenezin ana düzenleyicisidir ve vasküler gelişimin yanı sıra patolojik anjiogenezde de rol oynar. VEGF-A'nın izoformları olan VEGF₁₆₅ ve VEGF₁₂₁ dolaşımda bulunan asıl formlardır²⁻⁴. VEGF-A'nın hücre yüzeyindeki 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.

Böbrekte glomerülogenezis üzerine yapılan çalışmalarda VEGF-A'nın glomerüler filtrasyon bariyerinin kurulması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür⁵. Bu bulgularla uyumlu olarak, gelişmekte olan glomerülde podositler 165 izoformu baskın olmak üzere VEGF-A'nın tüm izoformlarını bulundurlar⁶.

Rekombinant insan anti-VEGF-A monoklonal antikor olan bevasizumab, sağkalımı uzattığı çeşitli faz III çalışmalarda klinik olarak kanıtlanmış ve kanser tedavisinde kullanılmak üzere onay almış ilk antianjiyogenik ajandır⁷. Bevasizumab VEGF'e bağlanarak endotel hücre yüzeyinde VEGF ile reseptörleri (Flt-1 ve KDR)

arasındaki etkileşimi engeller.

Bevasizumabın en belirgin yan etkileri hipertansiyon, proteinüri, tromboz, kanamaya meyil, yara iyileşmesinde gecikme olarak ortaya çıkmaktadır⁸. Daha nadiren hayatı tehdit edici olaylar (arteriyel trombotik olaylar, gastrointestinal perforasyon ve masif hemoptizi) bildirilmiştir. Bevasizumab veya anti-VEGF kullanımına bağlı gelişen hipertansiyon ve proteinürinin hangi mekanizmalarla ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir⁹. Ancak çeşitli çalışmalarda VEGF'ün hipotansif etkisi gösterilmiştir. 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. Ayrıca VEGF'nin glomerüler filtrasyon bariyerinin devamlılığında rol oynadığı düşünülmektedir. 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 gelişir¹⁰.

Klinikte, bevasizumab'a bağlı hipertansiyon oral antihipertansif ilaçlarla düzenlenmektedir¹¹. Bu sekonder hipertansiyonun tedavisi için seçilecek antihipertansif ilacın hangisi olması gerektiği konusu halen tartışmalıdır¹². Ancak sıklıkla anjiyotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI) kullanılmaktadır. Seçilecek antihipertansifin 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.

Materyal ve Metot

Deneysel Tasarı

Araştırmamız için toplam 36 adet erişkin dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. 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.

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 intra-kardiyak 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 kurban 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. Sıfırncı 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 sağlanmadığı 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 uygulanarak 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

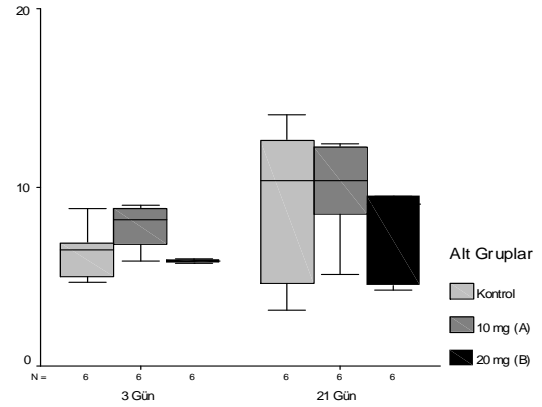
İlaç Uygulanması Sonrası Genel Gözlem

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

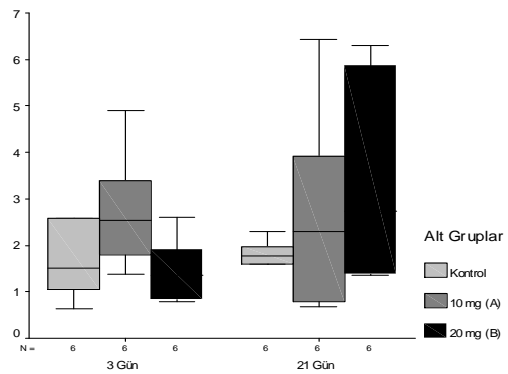
Üç Günlük Grubun Biyokimyasal Değerleri ve Karşılaştırmalar

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 karşılaştırıldığında, 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. Üçüncü gün idrar protein düzeyi ve protein/kreatinin oranı A grubunda B grubundan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,015$) (Şekil 1 ve 2). 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 sıfırinci gün



Şekil 1: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası günlük protein atımları



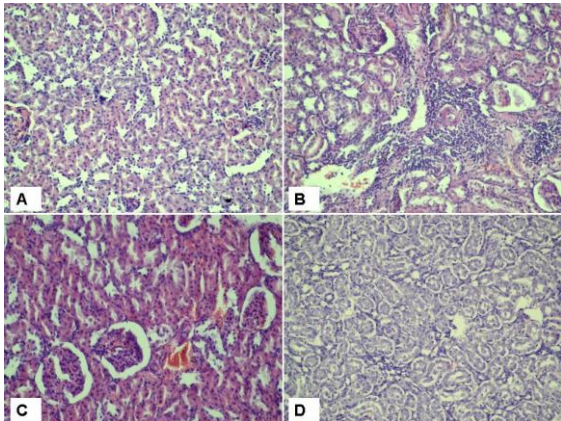
Şekil 2: Her iki ana grupta ilaç uygulanması sonrası protein/kreatinin oranları

ve üçüncü gün günlük protein atımları (sırasıyla 5,9 mg/gün; 8,2 mg/gün, $p=0,028$), günlük kreatinin atımları (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. 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.

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. 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). Tübül epitelinde dejenerasyon (TED), tübül epitelinde nekroz (TEN) ve tübül dilatasyonu (TD) hiçbir grupta belirgin şekilde oluşmamıştı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. 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). Konjesyon ve damar duvarında kalınlaşma (DDK) tüm gruplarda hafif düzeyde oluşmuştu ve gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Hiçbir alt grubun doku örneğinde interstisyel fibrozis bulgusuna rastlanmadı. Üç günlük grubun patolojik örnekleri Şekil 3'de verilmiştir.



Şekil 3: 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).

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 karşılaştırıldığında, 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). 10 mg/kg (A) grubunda ilaç öncesi ve sonrası laboratuvar incelemelerinin hiçbirinde anlamlı farklılık saptanmadı. Ancak protein/kreatinin oranı ilaç sonrası daha düşük olarak bulundu. Bu fark istatistiksel olarak sınırda anlamlıydı (p=0,046). 20 mg/kg (B) grubunda ise ilaç öncesi ve sonrası değerler arasında hiçbir biyokimya parametresi ve protein/kreatinin oranı açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 1 ve 2).

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. Tübül Epitelinde Dejenerasyon (TED) derecesi ilaç verilen sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla daha anlamlı olarak yüksek olarak gözlemlendi (p=0,038). Tübül epitelinde nekroz (TEN) kontrol grubundaki 6 sıçandan yalnızca birinde hafif şiddette gözlenirken, ilaç verilen gruplardaki sıçanların hepsinde gelişmişti. İlaç alan ve almayan sıçanlar arasındaki fark

istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,001$). Tübül dilatasyonu (TD), interstisyel inflamasyon (İİ) ve konjesyon tüm alt gruplarda hafif şiddette gözlemlendi. Aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. İlaç verilen sıçanların hepsinde patolojik değerlendirmede damar duvarında kalınlaşma saptandı. İlaç alanlarda kalınlaşma anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p=0,025$). Damar duvarında kalınlaşma yüksek doz grubunda daha belirgin olmasına karşın düşük doz grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0,182$). İnterstisyel fibrozis hiçbir grubun doku örneğinde gözlenmedi.

Tartışma

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. Anjiyogenik moleküller içinde en önemlisi ve antianjiyogenik tedavide üzerinde en çok durulanı VEGF'dir. Faz I çalışmalarında rekombinant insan anti-VEGF-A monoklonal antikor 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 açmıştır⁸. Günümüzde metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, glioblastoma ve metastatik meme kanseri tedavi protokollerinde halen kullanılmakta olan bevasizumabın en belirgin yan etkileri hipertansiyon, proteinüri, kanama ve tromboza eğilimdir^{7,13,14}. Bevasizumab kullanımı sırasında rastlanan böbrek yan etkilerinin hangi mekanizmayla ortaya çıktığı henüz bilinmemektedir. Bu deneysel rat çalışması, konuyla ilgili çalışmaların

düzenlenebilmesi için öncül bir deneysel sıçan modeli oluşturmak amacıyla planlanmıştır. Ve deneysel bir sıçan modeli oluşturmak için 10 mg/kg dozunda üç günlük bevasizumab uygulanmasının uygun olduğu gösterilmiştir.

Sugimoto ve arkadaşlarının¹⁵ 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. Transmisyon elektron mikroskopi ile inceleme sonucu glomerüler endotel hücre hipertrofisi, hasarı, glomerüler bazal membranda ayrılma ve slit diyaframlarda hasarlanma gösterilmiştir.

Maynard ve arkadaşlarının¹⁶ benzer bir çalışmada, 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 hızlandırmaktadır¹⁷. Ayrıca VEGF-A spesifik bir

aptamer ile glomerüler kapillerlerin tamirinin önlenmesi, hızlı ve masif tübülointerstisyel fibrozis gelişimine yol açmaktadır. Ostendorf ve arkadaşları¹⁸ in vivo olarak VEGF inhibisyonu yaptıkları bir çalışmalarında, 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 endotelial 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^{19,20}. 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 gerçekleştirerek ölmüşlerdir²¹. Kitamoto ve arkadaşları²² 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 arkadaşları²³

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 gösterilmiştir²⁴.

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 atılmaktadır²⁵. 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 düşündürmektedir²⁶.

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.

Yirmi bir 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 arkadaşları¹⁵ 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. Bevasizumabın yarı ömrünün kadınlarda 18, erkeklerde 20 gün olduğu bilinmektedir. Rattardaki yarı ömrü 9,7 gün olarak bildirilmiştir²⁷. 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; endotelial 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 desteklenmiştir¹⁵. Eremina ve arkadaşları²⁸, bevasizumabla tedavi edilen ve proteinüri veya böbrek yetmezliği gelişen 6 hastalık bir vaka serisinde 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 medyana gelmiş olabilir. Tüm bu patolojik bulgularımıza dayanarak erken dönemde meydana gelen bir glomerül hasarına karşı koruyucu bir etki gelişmiş olabileceği 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 glomerülo nefritli farelerde, soluble VEGFR-1 (sFlt-1) overekspresyonu yoluyla VEGF blokajının renal hasarı hızlandırdığı, ayrıca VEGF-A spesifik bir aptamer ile glomerüler kapillerlerin tamirinin önlenmesinin hızlı ve masif bir tübülointerstisyel fibrozis gelişimine neden olduğu gösterilmiştir¹⁷. 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 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 uygun olduğunu düşündürmektedir. Benzer bir çalışmada bevasizumabın sıçan VEGF reseptörlerine bağlanma özelliklerinin belirlenmesi ve elektron mikroskopik değerlendirme daha kesin sonuçlar verebilir.

Kaynaklar

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N Eng J Med.* 1971; 285(21):1182-6
2. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991;47(3):211-8
3. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11947-54
4. 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(1):18-32
5. Abrahamson DR. Development of kidney glomerular endothelial cells and their role in basement membrane assembly. *Organogenesis.* 2009;5(1):275-87
6. 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(2): 275-82
7. Qu CY, Zheng Y, Zhou M, et al. Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015;21(16):5072-80
 8. Klein A, Loewenstein A. Therapeutic Monoclonal Antibodies and Fragments: Bevacizumab. *Dev Ophthalmol.* 2016;55:232-45
 9. 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(2):186-93
 10. Miner JH. Focusing on the glomerular slit diaphragm: podocin enters the picture. *Am J Pathol.* 2002;160(1):3-5
 11. Dincer M, Altundag K. Angiotensin-converting enzyme inhibitors for bevacizumab-induced hypertension. *Ann Pharmacother.* 2006;40(12):2278-9
 12. Brandes AA, Bartolotti M, Tosoni A, Poggi R, Franceschi E. Practical management of bevacizumab-related toxicities in glioblastoma. *Oncologist.* 2015 Feb;20(2):166-75
 13. Launay-Vacher V, Janus N, Beuzeboc P, et al. Renovascular safety of bevacizumab in breast cancer patients. The prognostic value of hypertension and proteinuria. *Bull Cancer.* 2015 Nov;102(11):906-14
 14. Bumès E, Rzonza S, Hutterer M, et al. Adverse event grading following CTCAE v3.0 underestimates hypertensive side effects in patients with glioma treated with Bevacizumab. *J Neurooncol.* 2016 Mar;127(1):191-200
 15. 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;278(15):12605-8
 16. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111(5):649-58
 17. Hara A, Wada T, Furuichi K, et al. Blockade of VEGF accelerates proteinuria, via decrease in nephrin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2006;69(11):1986-95.
 18. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, et al. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest.* 1999;104(7):913-23
 19. 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(1):9-15
 20. 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(10):3090-4
 21. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380(6573):435-9
 22. 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(10):2351-7
 23. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126(6):1149-59
 24. Eremina V, Cui S, Gerber H, et al. Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):724-35
 25. 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(1):385-6
 26. Kang DH, Anderson S, Kim YG, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001;37(3):601-11
 27. Zalevsky J, Chamberlain AK, Horton HM, et al. Enhanced antibody half-life improves in vivo activity. *Nat Biotechnol* 2010;28(2):157-9
 28. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1129-36