

T.C

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**KRONİK HIPOKSİ İLE OLUŞTURULMUŞ
PULMONER ARTERİYEL HİPERTANSİYON HAYVAN
MODELİNE BEVACİZUMAB UYGULAMASININ
ETKİLERİ**

DR. CANAN KARAMAN

Tez Danışmanı

PROF. DR. EYÜP SABRİ UÇAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR 2010

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Atila Akkoçlu, Prof. Dr. Arif Hikmet Çımrın, Prof. Oya İtil, Prof. Dr. Oğuz Kılınç ve Prof. Dr. Can Sevinç'e,

Uzmanlık eğitimim sırasındaki değerli katkılarına ek olarak tezimin hazırlanmasıyla ilişkili tüm aşamalardaki büyük desteği ve anlayışı için Prof. Dr. Eyüp Sabri Uçan'a,

Uzmanlık tezimi hazırlamamda büyük katkıları bulunan Prof. Dr. Osman Yılmaz ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Meral Karaman ve onların şahıslarında, tüm deneysel hayvan araştırmaları laboratuvarına; Prof. Dr. Necati Gökmen, Prof. Dr. Canan Çoker ve Dr. Deniz Koçer'e; Uzm. Dr. Duygu Gürel ve Dr. Yasemen Adalı'nın şahsında tüm patoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Göğüs Hastalıkları Anabilimdalı'nda çalışan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve yardımcı personelimize,

Tezimin deneysel aşamalarında rotasyonda olmama rağmen büyük bir anlayışla beni destekleyen Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyeleri ve araştırma görevlileriyle birlikte tüm personeline,

Bilimsel araştırmanın olmazsa olmazlarından olan mali kaynak ve teknik hizmetlerin sağlanması açısından bizim için ellerinden geleni yapan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Fon Saymanlığı'nın tüm yönetici ve çalışanlarına,

Çalışma için gereken malzemelerin tam zamanında ve en uygun şekliyle elimize ulaşmasını sağlayan tüm tedarikçi firmalara,

Tezimin ve hayatımın her aşamasında, büyük bir özveri ve sevgiyle bana destek olan; can dostum Dr. Emre Yıldırım'a

ve

Beni yalnızca dünyaya getirmekle kalmayıp hayata da en olumlu ve en güzel şekilde hazırlayan sevgili annem Şerife Karaman ve sevgili babam Turgay

Karaman'a ,

TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER:

| | |
|---|----|
| 1. KISALTMALAR..... | 4 |
| 2. TABLO VE ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | 5 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 6 |
| 4. GENEL BİLGİLER..... | 9 |
| 4.1. Pulmoner Hipertansiyon Patogenezi..... | 9 |
| 4.1.1. PAH Patogenezi ve Vasküler Etkenler..... | 9 |
| 4.1.2. PAH Patogenezi ve İmmun Sistem..... | 10 |
| 4.1.3. PAH Patogenezi ve Remodeling..... | 11 |
| 4.1.4. PAH Patogenezi ve Genetik..... | 12 |
| 4.1.5. PAH Patogenezi ve Çevresel Faktörler..... | 13 |
| 4.2. Pulmoner Hipertansiyon Sınıflaması..... | 14 |
| 4.3. PAH Semptomları..... | 16 |
| 4.4. PAH Tanısı..... | 17 |
| 4.5. PAH Tedavisi..... | 17 |
| 4.5.1. Önleyici/Koruyucu Tedaviler..... | 18 |
| 4.5.2. Nonspesifik Tedaviler..... | 18 |
| 4.5.3. Spesifik Tedaviler..... | 19 |
| 4.5.4. Alternatif Tedaviler..... | 20 |
| 4.5.5. Yeni Tedavi Seçenekleri Niçin Gerekli?..... | 21 |
| 4.6. Pulmoner Hipertansiyon Hayvan Modelleri..... | 22 |
| 4.7. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Akciğer..... | 23 |
| 4.8. VEGF ve PAH..... | 24 |
| 4.9. Bevacizumab..... | 26 |
| 5. GEREÇ ve YÖNTEM..... | 27 |
| 6. SONUÇLAR..... | 35 |
| 6.1. Kilo Takipleri..... | 35 |
| 6.2. Hemodinamik Ölçümler..... | 36 |
| 6.3. Sağ Ventrikül Hipertrofisi..... | 38 |
| 6.4. Serum VEGF Düzeyleri..... | 39 |
| 6.5. Pulmoner Arter Morfometrik Ölçümleri ve İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları..... | 40 |

| | |
|--------------------------|----|
| 7. TARTIŞMA..... | 45 |
| 8. ÖZET..... | 54 |
| 8.1. Türkçe Özet..... | 54 |
| 8.2. İngilizce Özet..... | 56 |
| 9. KAYNAKLAR..... | 58 |

KISALTMALAR:

| | |
|--|--|
| ALK-1: Aktivin reseptör-like kinaz | MCT: Monokrotalin |
| BMP: Kemik Morfogenetik Proteini | MK: medial kalınlık |
| BMPR: Kemik Morfogenetik Proteini Reseptörü | MMP: Matriks Metalloproteinazları |
| BVC: Bevacizumab | NO: Nitrik Oksit |
| CO: Karbon Monoksit | NOS: Nitrik Oksit Sentetaz |
| EGF: Epitelyal büyüme faktörü | NSCLC: Küçük hücreli dışı akciğer karsinomu |
| ET: Endotelin | OH + SF: Oda havası + Serum fizyolojik |
| FDA: Food and Drug Administration | OH + BVZ: Oda havası + Bevacizumab |
| FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü | PAB: Pulmoner Arter Basıncı |
| GIS: Gastrointestinal sistem | PAH: Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon |
| HIF-1: Hipoksi indüklenmiş faktör-1 | PDGF: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü |
| HO-1: Hemoksijenaz-1 | PHT: Pulmoner Hipertansiyon |
| IAH: İnterstisyel Akciğer Hastalıkları | PIGF: Plasental büyüme faktörü |
| IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü | RVPm: Ortalama sağ ventrikül basıncı |
| ip: intraperitoneal | SF: serum fizyolojik |
| KGF: Keratinosit büyüme faktörü | TGF: Doku Büyüme Faktörü |
| KH + SF: Kronik hipoksi + Serum fizyolojik | VEGF: Vaküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| KH + BVZ: Kronik hipoksi + Bevacizumab | VIP: Vazoaktif İntestinal Peptid |
| KOAH: Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı | WHO: Dünya Sağlık Örgütü |
| LVPs: Sistolik sol ventrikül basıncı | |

TABLO LİSTESİ:

Tablo 1: Modifiye Pulmoner Hipertansiyon Sınıflaması (2004)

Tablo 2: WHO PAH Fonksiyonel Sınıflaması

ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarından örnekler

Şekil 2: Deney düzeneğine bağlı halde olan anestezi gaz monitörü ile iç ortam oksijen ve karbondioksit ölçümlerinin yapılması

Şekil 3: Deney düzeneği (fanus) içinde soda lime granüllerinin kullanılması

Şekil 4: Bevacizumab ve SF uygulaması

Şekil 5: Hayvanların genel anesteziye alınmaları ve operasyon hazırlığı

Şekil 6: Anterior torakotomi yaklaşımıyla kalbe ulaşılması ve doğrudan intrakardiyak ölçümlerin yapılması

Şekil 7: Basınç ölçümleri sonrası kan ve akciğer örneklerinin alınması

Şekil 8: Serum örneklerinin santrifüj işlemiyle elde edildikten sonra -80 °C buzdolabında saklanması

Şekil 9: Fulton indeks ölçümü için sağ ventrikülün septum ve sol ventrikülden ayrılması

Şekil 10: Hayvanların 1., 5. ve 8. gündeki kilo takipleri

Şekil 11: Sağ ventrikül basınçlarının hipoksi ve bevacizumab uygulaması ile ilişkisi

Şekil 12: Sol ventrikül basınçlarının hipoksi ve bevacizumab uygulaması ile ilişkisi

Şekil 13: Fulton indekslerinin hipoksi ve bevacizumab uygulamaları ile ilişkisi

Şekil 14: Serum VEGF konsantrasyonlarının gruplara göre dağılımı

Şekil 15: Küçük pulmoner arterlerin hematoksilen & eosin boyamaları (x40 büyütmede)

Şekil 16: Medial kalınlık (MK) değerlerinin gruplara göre dağılımı

Şekil 17: Medial kalınlık % (MK%) değerlerinin gruplara göre dağılımı

Şekil 18: Küçük pulmoner arterlerin VEGF antikor boyanmaları (1/200 dilusyon ile x40 büyütmede)

Şekil 19: Doku VEGF skorlarının gruplara göre dağılımı

GİRİŞ VE AMAÇ:

Pulmoner hipertansiyon genel tanımıyla, pulmoner arter basınçlarında yükseklik saptanmasıdır (1). Pulmoner arter basınç değerlerinin istirahatte 25 mmHg ve egzersizde 30 mmHg'nın üzerinde olmasıyla birlikte pulmoner kapiller kama basıncının da 15 mmHg'nın altında olması pulmoner hipertansiyon olarak tanımlanır (1, 2, 3, 4).

Pulmoner hipertansiyonun kendisinin neden olduğu morbidite ve mortalite kadar önemli olan bir diğer unsur da bu hastalığa ikincil gelişen sağ ventrikül hipertrofisiyle birlikte giden sap kalp yetmezliğidir (4). Yapılan klinik araştırma sonuçlarına göre PAH'lu hastaların prognozunu belirleyen en önemli faktör sağ ventrikül yetmezliğidir (5).

Etkilediği damar türleri bakımından arteriyel ve venöz pulmoner hipertansiyon diye iki alt gruba ayrılmasına rağmen bu hastalık; esasen pulmoner arterleri tutan bir hastalık olması ve venöz tutulumun ön planda olduğu olgularda da çoğunlukla bu duruma, arteriyel tutulumun da eşlik ediyor olması sebebiyle, günümüzde pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) terimi daha sıklıkla kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu dünya çapında yaklaşık olarak 25 milyon insanın PAH'dan etkilendiği düşünülmektedir (4). İdiopatik PAH'nun insidansı milyonda 1-2 olarak bildirilmiştir (6). Son olarak, 2006 yılında Fransa'da Humbert M ve ark.'larının yapmış olduğu bir araştırmaya göre PAH prevalansı milyonda 15 olgudur. Hastalarda ortalama tanı konulma yaşı 50 ± 15 'dir. Kadın:erkek oranı 2:1'dir. Hastaların ortalama pulmoner arter basınçları ise 55 mmHg'dır (7).

Bunun yanında, sekonder PAH'nun yaygınlığıyla ilgili elimizde net bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, özellikle son yıllarda, kronik sigara kullanımı ve buna bağlı olarak akciğer hastalıklarında görülen artışlar ile; malignitelere ve artmış yaş ortalamasına bağlı hiperkoagulopatiler sebebiyle artan tromboembolik hastalıklara ikincil olarak gelişen PAH olgu sayısında artış olduğu, pek çok klinisyenin paylaştığı ortak bir gözlemdir.

Bu önemli sağlık sorununun klinik pratikte görece seyrek olarak görülüyor olmasına rağmen, tıbbi önemi çok büyüktür. PAH, kesin tedavisi henüz bulunmayan ve genellikle kısa sürede ölüme sonuçlanan bir hastalıktır (8). Mevcut tedavi

seçenekleri ancak hastalığın progresyonunun yavaşlatılması ve hastanın yaşam kalitesinin artırılmasını sağlayabilmektedir (8). Hem hastalığın patogenezinin henüz yeterince aydınlatılamamış olması, hem de mevcut tedavi seçeneklerinin bu hastalığın tedavisinde yetersiz kalıyor olması sebebiyle PAH; bu alanda çalışan klinisyenler ve araştırmacılar için önemini ve popülerliğini yıllardır korumaktadır.

Son yıllarda, bu alanda yoğunlaşan araştırmaların merkezinde; hastalığın patogenezinin anlamak ve bunun üzerinden yeni tedavi seçenekleri geliştirmek veya mevcut tedavi seçeneklerinin etkinliğini arttırmak gibi konular bulunmaktadır. PAH tanısı olan hastaların kritik klinik tabloları ve etik sorumluluklar sebebiyle bu hastaların yer aldığı tıbbi çalışmalarla, sınırlı miktarda bilgi edinilebilmektedir. Elde edilen verilerin çoğu da ilaç etkinliğiyle ilgili klinik parametrelere veya postmortem histolojik çalışmalara dayanmaktadır. Bu kısıtlılıklar sebebiyle bu alanla ilgili çalışmalar büyük ölçüde deneysel çalışmalar yönüne kaymıştır.

PAH patogenezi ve yeni tedavi ajanlarının etkinliklerinin değerlendirilmesiyle ilgili deneysel hayvan çalışmalarının sayısı her geçen yıl artış göstermektedir. Bu çalışmalar tirozin kinaz inhibitörleri, Rho-kinaz yolağı, 5-HT yolağı gibi bazı patolojik süreçler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Tirozin kinaz inhibitörlerinden PDGF inhibitörü imatinib'in Faz I çalışmalarda elde ettiği başarıyla; yıllardır VEGF üzerinde yapılan pek çok deneysel çalışmanın verileri birleştirildiğinde VEGF antikoru ve bunların PAH'a olan etkileri üzerine yeterli sayıda çalışma bulunmadığı ve var olan bazı çalışmaların sonuçlarının da çelişkili bilgiler sunduğu gözlemlenmiştir.

VEGF antikoru olan bevacizumab anjioneogenez üzerine kuvvetli inhibisyon etkisinin bulunması sebebiyle gastrointestinal sistem kanserleri başta olmak üzere pek çok kanser türünde kemoterapi ajanı olarak kullanılmakta olan bir ajandır. Ancak; bu ilacın pulmoner vasküler sisteme olan etkileriyle ilgili (olumlu veya olumsuz yönde) ne prospektüs ne de literatür düzeyinde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmamızda kronik hipoksi maruziyetiyle oluşturmuş olduğumuz PAH hayvan modelinde, VEGF antikoru olan bevacizumabın etkinliğinin olup olmadığının ve varsa bu etkinin ne yönde olduğunun gösterilebilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; öncelikle, sıçanlarda kronik hipoksiye ikincil PAH modeli oluşturulmuş

ve ardından kontrol ve deney gruplarına bevacizumab uygulaması yapılarak gerekli hemodinamik, morfometrik ve immunohistokimyasal ölçümlerle hem modelin başarısı hem de uygulanmış olan ilacın etkinliğine yönelik istatistiksel analizler yapılmış ve sonuçlar ayrıntılı olarak paylaşılmıştır.

GENEL BİLGİLER:

Pulmoner Hipertansiyon Patogenezinin Genel Bakış:

Bu hastalığın patogenezinin temelinde küçük pulmoner arterlerin ilerleyici daralması/tıkanıklığı yatmaktadır ve bu durum sıklıkla sağ kalp yetmezliği ve ölüme neden olur (7, 9). Pulmoner vasküler lezyonlarda vazokonstriksiyon, vasküler remodeling ve in situ trombozis bulunmaktadır (4, 8, 9, 10). Bu süreçler de özetle enflamasyon ve anjioneogenezi tetikler (8). Endotel hücrelerinin vasküler düz kas hücrelerine diferansiasyonuyla birlikte çeşitli mediatörlerin salınımı veya mediatörler arası dengenin bozulması gibi faktörler de önemli rol oynamaktadır (8).

PAH'un neredeyse tüm alt tiplerinde ortak olan bazı histolojik özellikler vardır. Bunlar arasında en önemlileri özetle; intimal fibrozis, vasküler düz kas hücrelerinin distal lokalizasyon ve proliferasyonu ile pulmoner arteriyel okluzyondur (8, 10, 11). Buna ek olarak, ağır PAH formlarında; "neointima" adı verilen ekstrasellüler matriksin ve myofibroblastların artmış birikimi ile karakterize lezyonlar izlenmektedir (8). Pleksiform lezyonlar ise; damar lümenini daraltan, endotel-benzeri hücrelerin artmış proliferasyonu ile karakterizedir (8). Tüm bunlara ek olarak, pulmoner arteriollerin tüm tabakalarında-intima, media, adventisya-inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttur (11).

PAH'nun genetik ve çevresel süreçlerini (4, 12); sistematik ve anlaşılabilir bir şekilde inceleyebilmek amacıyla patogeneziyle ilgili temel bilgiler aşağıdaki şekilde bölümlere ayrılarak tek tek ele alınmıştır.

PAH Patogenezi ve Vasküler Etkenler:

Başlangıçta yalnızca, hipoksi ve hipoksiye ikincil vazokonstriksiyonla açıklanan pulmoner hipertansiyonun aslında vasküler düz kas hücrelerinin damar duvarının üç katmanını da etkileyecek şekilde anormal proliferasyonu sonucu geliştiği gösterilmiştir (1). Böylece damar yapısında intimal hiperplazi, medial hipertrofi ve adventisyal proliferasyon bir arada görülebilmektedir (1). Bu anormal büyüme ve kalınlaşmanın hangi olaylar sonucunda geliştiği henüz tam olarak bilinmemektedir ancak yapılan çalışmalar sonucu, bu konuyla ilgili bazı önemli ipuçları elde edilmiştir (1).

Vasküler mediatörler arasında birkaç yolak özellikle öne çıkmaktadır. Bunlar arasında NO yolağı ve NOS aktivitesi (2, 4, 8, 10, 13), Hemoksijenaz (HO-1) yolağı ile birlikte karbon monoksit (CO) ve hidrojen sülfid üretimi (8), prostasiklin-tromboksan yolağı (2, 3, 4, 13), endotelinler (3, 4, 13), vazoaktif intestinal peptid (VIP) (2, 4, 8, 13), VEGF ve reseptörleri, Rho-kinaz yolağı (8, 9, 14), voltaj kapılı potasyum kanalları (2, 8), BMP yolağı (8), kaveolin-1 (CAV-1), proinflamatuvar sitokinler (TGF- β , bradikinin, fraktalkin, RANTES, lökotrienler gibi), 5-HT transporter yolağı (2, 4, 10) ve matriks metalloproteinazlar (MMP) sayılabilir (8).

PAH Patogenezi ve İmmun Sistem:

PAH pek çok hastalığa sekonder olarak gelişebilmekle birlikte özellikle otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlara ikincil PAH formları, hastalığın patogenezi ile immün sistem arasındaki bağlantıları gösterebilmesi bakımından önemli ipuçları sunmaktadır (11). Yapılan çalışmalar sonucu; skleroderma, sistemik lupus eritematozis, Sjögren's sendromu, polimiyozit, Hashimoto tiroiditi, HIV ve HHV-8 ilişkili PAH gelişimiyle CD4 T hücre komponentine zarar veren otoimmün antikorlar arasında anlamlı ilişkiler saptanmıştır (11, 15). Aynı zamanda splenektomi sonrası PAH geliştiğini bildiren yayınlar da bu durumu destekler görünmektedir (11). Buradan yola çıkarak, T hücrelerinin fonksiyonel veya sayısal sorunları ile pulmoner vasküler hasarlanma arasında ilişki olduğu düşünülmektedir (11).

Perivasküler enflamasyondaki temel rol mast hücreleri ve lenfositlere aittir (11). Anti-nükleer ve anti-endotelyal antikorların pozitifliği, PAH'lı hastaların akciğer dokularında antikor-kompleman depozitlerinin varlığı, pleksiform lezyonların etrafındaki inflamatuvar hücrelerin bulunması gibi otoimmün fenomenlerin mevcudiyeti sebebiyle PAH patogenezinde immün-aracılı patogenezin de önemli rol oynadığı düşünülmektedir (11). Özellikle vasküler hasarlanma sonrası erken evrede meydana gelen artmış immün yanıt ve şiddetli enflamasyonun pulmoner vasküler obliterasyonun temel nedeni (anormal endotelyal hücre proliferasyonuna ikincil) olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (11). Literatürde yer alan bu bilgilere ek olarak; Taraseviciene SL ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada atimik sıçanlarda T hücrelerinin bulunmamasının vazo-obliteratif remodelinge sebep olduğu da gösterilmiştir (11).

Bu mekanizmalara ek olarak, yapılan immunohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir ki; TGF- β , matriks proteinleri (kollajen, elastin, fibronektin, tenascin-C ve glikozaminoglikanlar gibi), makrofajlar ve T hücreler de PHT'lu hastaların akciğer dokularında artmıştır (2).

PAH ve Remodeling:

Pulmoner vasküler remodeling belki de PAH patogenezindeki en önemli mekanizmadır. Vasküler remodeling sonucunda pulmoner vasküler direnç artar ve komplians azalır (16). Bu durum, pulmoner arter düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde meydana gelen belirgin proliferasyonun ve buna ikincil gelişen pulmoner kan akımındaki obstruksiyonun sonucudur (16). Bu mekanizmadan yola çıkan araştırmacıların son dönemdeki temel hedefleri antiproliferatif ve antianjiojenik tedavi seçenekleridir (16). Örneğin; PDGF reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan ve Faz 2 çalışması tamamlanmış olan imatinibin, PAH'da remodelingin bir kısmını geri döndürdüğü ve pulmoner hemodinamiklerin de dahil olduğu pek çok parametrede düzleşme sağladığı gösterilmiştir (16). Antiproliferatif immunsupresor bir ilaç olan ve hücreleri G1 fazında durduran rapamisinin de vasküler remodeling üzerine etkilerinin olduğu hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir (16). [Rapamisin klinikte koroner stentlerin restenozunu önlemek amacıyla kullanılan bir ajandır]. Yine simvastatin'in de neointimal vasküler okluzyonu geri döndürebildiği gösterilmiştir (17, 18).

Remodeling gelişirken, damarların-özellikle de arterlerin- her üç katmanında da -intima, media, adventisya- kalınlaşma meydana gelir ve bu değişikliklerin kalıcı olduğu varsayılır (16). Remodeling oluşmasında pek çok mediatör ve yolağın etkin olduğunun bilinmesine rağmen (BMPR-2 mutasyonu, serotonin transporter yolağı, PDGF yolağı, K ve Ca kanal defektleri,... gibi) tetiği çeken temel mekanizmanın ne olduğu konusu henüz aydınlatılamamıştır (16). Bilindiği kadarıyla, vasküler remodelingin temel mediatörleri; VEGF, TGF- β , FGF ve PDGF'dür (19).

Tüm bunlara ek olarak, PAH'daki pulmoner arter düz kas hücrelerinin davranış şekliyle kanser hücrelerinin davranışının benzer olması ve her iki hastalıkta da temelde mitokondrial bozuklukların bulunuyor olması gibi nedenlerle PAH'un kanser benzeri bir durum olduğu da düşünülmektedir (16). PAH'un ilerleyen

dönemlerinde, altta yatan neden ne olursa olsun, patogonomik ve oldukça kompleks vasküler yapılar olan pleksiform lezyonlar görülür (16). Bu yapılar; myofibroblastlardan oluşan bir stroma içindeki disorganize monoklonal endotel hücre proliferasyonundan meydana gelmiştir (16). Pleksiform lezyonları oluşturan endotel hücrelerinin en önemli özelliği, fenotipik olarak apoptozise rezistan hücreler olmalarıdır (16). Bu durumu açıklayacak şekilde, Human Herpes Virus-8 (HHV-8) ile enfekte pulmoner vasküler endotel hücrelerinin de apoptozis-rezistan bir fenotip kazandıkları ve daha sonra da PAH geliştirdikleri gösterilmiştir (16).

Bir kez vasküler remodeling geliştiğinde artık vazodilatör tedavilerin tek başına etkili olamayacağı söylenebilir. Bu aşamadan sonra, vasküler remodeling üzerine etkisi olabilmesi bakımından, tedavinin esasını mutlaka antiproliferatif ajanların oluşturması uygun olacaktır (16).

PAH'da temel mekanizmanın endotel disfonksiyonu olmasının yanında; süreç kronikleştikçe vasküler duvarın birer komponenti olan düz kas hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücrelerinin proliferatif ve antiapoptotik sürecine ikincil olarak vasküler remodeling gelişir (3). Bu durum, esas olarak neoplastik süreçleri taklit eden bir durumdur (3). Hücre siklusu ve apoptozisindeki bu disregülasyona dayanarak bazı araştırmacılar primer pulmoner hipertansiyonu "pulmoner arterlerin kanseri" olarak nitelendirmektedirler (1, 8). PAH, neoplastik bir hastalık olmamasına ve doku invazyonu/metastaz göstermemesine rağmen; ağır PAH formları ile maligniteler arasında moleküler ve hücresel benzerlikler bulunmaktadır (4). Bu bilgidен hareketle, son zamanlarda, antineoplastik bazı ajanların PAH üzerine etkilerini araştıran pek çok çalışma yapılmaktadır (4).

PAH Patogenezi ve Genetik:

PAH'un farkedildiği günden itibaren bu hastalığın ailesel ve/veya genetik bir yönünün olabileceği çeşitli klinik gözlemlerle ortaya konulmuş ve çeşitli PAH aileleri tanımlanmıştır (12, 20). PAH genetiği ile ilgili kilit gelişme 2000 yılında iki bağımsız araştırmacı grubu tarafından BMPR II mutasyonunun saptanmasıdır (8, 12, 20). Bu gelişmenin hemen ardından TGF- β süperailisinin bir üyesi olan ALK-1 (Aktivin reseptör-like kinaz) (endoglin) reseptöründe de mutasyon tespit edilmiş (8,

12); sonrasında ise serotonin 5-HT transporter geninde de mutasyon gösterilmiştir (4, 8).

PAH'lu hastaların yaklaşık %6'lık kısmını ailesel PAH oluşturur (8, 20). Ailesel PAH'lu olguların %60-80'inde BMPR2 gen mutasyonu olduğu gösterilmiştir (2, 8, 12, 20, 21). Ayrıca, idiopatik PAH olgularının da %10-30'unda da bu gende mutasyon tespit edilmiştir (2, 8, 12, 15, 20, 22). Ancak; BMPRII mutasyonu olan kişilerin sadece %20'sinde ailesel PAH gelişir (2, 15, 22). Bu da göstermektedir ki bu gen mutasyonunun penetrasyonu oldukça düşüktür (%15 ile %80 arasında değişmektedir) (2, 12, 20).

Son yıllarda PAH patogenezi ile ilişkili olarak ilginç büyüme faktörlerine kaymış olması sebebiyle bu alanda da önemli çalışmaların sonuçları yayınlanmıştır. VEGF upregulasyonunun pleksiform lezyon oluşumuyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (23). Bunun nedeninin; distal arterioller okluzyonlarda tamamlanmamış bir revaskülarizasyon girişimi olduğu düşünülmektedir (23). Campbell A.I.M ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada MCT ile oluşturulmuş PAH hayvan modelinde, azalmış serum ve doku VEGF düzeylerinin, VEGF'nin hücre-aracılı gen transferi yöntemiyle artırılması sonucunda, pulmoner arter basınçlarında anlamlı düşmeye neden olabildiği gösterilmiştir (23).

Bütün bu bilgiler ışığında; PAH aileleri gibi PAH geliştirme riski çok yüksek kişilere genetik tarama yapılmasının uygun olacağı düşünülmüştür (12, 20). Çift vuruş hipotezi gereği genetik mutasyon saptanan kişilere koruyucu önlemler konusunda bilgi verilmesi, bu kişilerde PAH gelişmesini geciktirebilir veya önleyebilir (12, 20). Ancak, diğer PAH gruplarında genetik tarama henüz önerilmemektedir (12, 20).

PAH Patogenezi ve Çevresel Faktörler:

PAH gelişiminde genetik faktörlere ek olarak çeşitli çevresel faktörlerin de rol oynadığı gösterilmiştir. Bunlar arasında en önemlileri; kronik hipoksi, hemoglobinopatiler, otoimmün vasküler hastalıklar, viral enfeksiyonlar, şant oluşturan konjenital kalp hastalıkları ve serotonerjik anoreksijenler ile metamfetaminler ve kokain gibi santral sinir sistemi stimulanlarının kullanımınıdır (8). Mekanizmaları daha az tanımlanmış olan etkenler arasında ise; trombositoz, santral

sinir sistemi stimulanları, portal hipertansiyon, yenidoğanın persistan pulmoner hipertansiyonu ve kadın cinsiyet yer alır (8).

Pulmoner Hipertansiyon Sınıflaması:

Primer pulmoner hipertansiyon ilk olarak Romberg tarafından 1891 yılında tanımlanmıştır (1). Bunu takip eden 60 yıl boyunca çok az sayıda oldu bildirilmiştir (1). Wood tarafından 1950’de kardiyak kateterizasyonun keşfinden sonra saptanan olguların sayısında hızlı bir artış meydana gelmiştir (1).

Giriş bölümünde tanımı ve genel özellikleri hakkında bilgi verilmiş olan PAH’un sınıflaması, tanımı kadar net değildir. Yıllar içinde hastalığın patogenezi ve klinik özellikleriyle ilgili bilgiler arttıkça PAH sınıflamasında da önemli değişiklikler meydana gelmiştir. 1998’de yayımlanan Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması’ndan sonra 2003’de Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumu’nda yeni bir sınıflama daha ortaya konulmuştur (1, 4). Son olarak, 2008’de yapılan 4. Dünya Pulmoner Hipertansiyon Sempozyumu’ndaki minor değişikliklerle pulmoner hipertansiyon sınıflamasının şu anda kullanılmakta olan son şekline varılmıştır (2). Son PAH sınıflaması; patoloji, hastalık mekanizması ve terapötik ajanlara yanıt gibi kriterler esas alınarak yapılmıştır (4).

2008 yılında yapılan minör değişikliklerin dışında, günümüzde, temel olarak, 2004 yılında oluşturulmuş olan Modifiye Evian Sınıflaması kullanılmaktadır (24). 2008 yılında yapılan minör değişiklikler * işareti konularak tabloda belirtilmiştir.

Tablo 1: Modifiye Pulmoner Hipertansiyon Sınıflaması (2004)

| |
|--|
| <p>A. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH) (Sınıf 1 PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. İdiopatik PAH 2. Ailesel PAH 3. Bağ doku hastalıkları, konjenital sol-sağ şantlar, portal hipertansiyon, HIV enfeksiyonu, anoreksijenler, ilaç ve toksinler, diğer nedenler ile ilişkili PAH 4. Ek venöz veya kapiller tutulum ile birlikte olan PAH (pulmoner veno-okluziv hastalık ve pulmoner kapiller hemanjiomatozis) 5. Yenidoğanın persistan pulmoner hipertansiyonu 6. Şistozomiasis ve kronik hemolitik anemiye ikincil PAH* 7. Pulmoner veno-okluziv hastalık ve pulmoner kapiller hemanjiomatozis* |
| <p>B. Sol Kalp Hastalıklarıyla İlişkili PHT (Sınıf 2 PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sol atriyel veya ventriküler kalp hastalığına ikincil PAH 2. Sol valvüler kalp hastalığına ikincil PAH |
| <p>C. Akciğer Hastalığı veya Hipoksi İle İlişkili PHT (Sınıf 3 PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. KOAH'a ikincil PAH 2. IAH'larına ikincil PAH 3. Uyku apne sendromlarına ikincil PAH 4. Alveoler hipoventilasyon sendromlarına ikincil PAH 5. Kronik olarak yüksek rakımda yaşamaya ikincil PAH 6. Gelişimsel anomalilere ikincil PAH |
| <p>D. Kronik Trombotik veya Embolik Hastalığa İkincil PHT (Sınıf 4 PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Proksimal pulmoner arterlerin tromboembolik obstruksiyonu 2. Distal pulmoner arterlerin tromboembolik obstruksiyonu 3. Nontrombotik pulmoner emboli (tümör, parazitler, yabancı cisim) |
| <p>E. Diğer Nedenlere Bağlı PHT (Sınıf 5 PAH)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sarkoidoz, pulmoner Langerhans' hücre histiositozu, lenfanjioleiomyomatozis 2. Pulmoner damar basısı (adenopati, tümör, fibrozan mediastinit) |

PAH Semptomları:

Primer pulmoner hipertansiyonun en önemli semptomu dispnedir ve hastaların %95'inde görülmektedir (1). Hastalığın erken dönemlerinde egzersiz dispnesi şeklinde başlasa da ilerleyen dönemlerde istirahatte de olacak şekilde ağırlaşmaktadır (1, 2). Pulmoner hipertansiyondaki dispnenin en önemli sebebi kardiyak outputun artmış metabolik ihtiyaca yanıt verecek yeterlilikte olmamasıdır (1). Dispnenin yanında halsizlik ve güçsüzlük de önemli belirtilerdir (1, 2). Bu durum, azalmış kardiyak outputa ikincil bozulmuş doku oksijenizasyonunun bir sonucudur. (1). Bu belirtiler, kardiyak kateterizasyon sırasında, kardiyak outputtaki azalma ve azalmış venöz pO₂ sebebiyle belirginleşmektedir (1). Egzersiz sırasında olan, sol kola ve omuza yayılan substernal göğüs ağrısı da görülebilmektedir (1). Ağrının şekli angina pectorise benzer ve temel olarak egzersize bağlı olarak artan sağ ventrikül işi ve hipoksemiye bağlı koroner yetmezlik ile ilişkilendirilmektedir (1). Bazı hastalarda, azalmış serebral kan akımına ikincil, senkop da başlangıç semptomu olarak görülebilmektedir (1). Ayrıca, mikrovasküler anevrizmaların rüptürüne bağlı olarak hemoptizi de görülebilir (1). Tüm bu belirtiler göz önüne alınarak Tablo 2'de görüldüğü şekilde fonksiyonel sınıflama yapılarak hastanın tanı sonrası klinik yönetimi belirlenmeye çalışılır.

Tablo 2: WHO PAH Fonksiyonel Sınıflaması (3)

| Fonksiyonel Sınıf | Açıklama |
|-------------------|---|
| I | Günlük fiziksel aktivitede kısıtlılık yoktur |
| II | İstirahatte rahatsızlık yoktur. Ancak normal fiziksel aktiviteyle dispnede artış, yorgunluk, göğüs ağrısı veya presenkop vardır. |
| III | İstirahatte rahatsızlık yoktur. Ancak, minimal sıradan aktivite ile dahi dispnede artış, halsizlik, göğüs ağrısı veya presenkop vardır. |
| IV | İstirahatte dahi hiçbir fiziksel aktivite yapılamaz. Sağ ventrikül yetmezliği bulguları mevcuttur. |

PAH Tanısı:

Tanıda pek çok laboratuvar yöntemi kullanılabilmesine karşın altın standart tanı yöntemi kardiyak kateterizasyon ile doğrudan pulmoner arter basıncının ölçülmesidir (1). İnceleme sırasında diğer kardiyak patolojiler ekarte edilebildiği gibi akut vazoreaktivite testi (inhale nitrik oksit, adenozin veya prostasiklin kullanılarak) de yapılabilir (1).

PAH Tedavisi:

Pulmoner hipertansiyon tedavisinde temel prensip öncelikle bu durumun primer/idiopatik mi yoksa sekonder mi olduğunun ayırdedilmesidir. Altta yatan bir hastalığa ikincil gelişmiş olan pulmoner hipertansiyonun tedavisinde altta yatan hastalık veya duruma yönelik tedaviler öncelik kazanmaktadır (1). PAH'ın idiopatik veya sekonder olup olmamasına bakılmaksızın ortak tedavi hedefleri ortaya konulmuştur. Bunlar;

- Vazorelaksasyonun sağlanması,
- Hücresel proliferasyonun baskılanması,
- Pulmoner arter duvarındaki apoptozisin uyarılması,
- Pulmoner vasküler direncin azaltılarak kardiyak outputun artırılması,
- Patogenez üzerine olan bu etkilere bağlı olarak da klinik semptomların azaltılması, yaşam kalitesinin artırılması ve hastalığın progresyonun olabildiğince yavaşlatılması olarak özetlenebilir (3, 4).

PAH tedavisi temel olarak önleyici/koruyucu tedaviler, nonspesifik tedaviler ve spesifik tedaviler olmak üzere 3 ana grupta incelenebilir;

- a. Önleyici/Koruyucu Tedaviler
- b. Nonspesifik Tedaviler
- c. Spesifik Tedavileri
- d. Alternatif Tedaviler

A. Önleyici/Koruyucu Tedaviler:

Tüm hastalıklarda olduğu gibi, öncelikli tedavi önleyici tedavilerdir. Pulmoner arter basıncını arttırıcı ve kardiyak outputu azaltıcı etki gösteren sıcak banyoda uzun süre kalma, zorlu egzersiz, yüksek rakımda uzun süre bulunma, uçak seyahati, kalp hastalıkları, hipoksi maruziyeti ve sigara içme gibi etkenlerin mutlaka ortadan kaldırılması gerekmektedir (1, 24).

Gebelik de, kardiyovasküler sistem üzerine getirdiği ek yük sebebiyle, başka bir riskli durumdur (1, 24). PAH'lu kadınların gebe kalmasının önlenmesi önerilmektedir. Ancak doğum kontrol yöntemi olarak oral kontraseptifler gibi hormonal yöntemlerin yerine, mekanik bariyer yöntemleri veya cerrahi yöntemler tercih edilmelidir (1, 24). Eğer gebelik meydana gelmişse hastaya mutlaka abortus önerilmelidir. Ancak abortus amaçlı olarak, prostaglandin F₂ α kullanılmamalıdır (1).

Bunlara ek olarak, PAH tanısı almış hastalarda her türlü anestezi uygulaması ve operasyonlardan kaçınılmalı; hayatı tehdit eden durumlar dışında bu hastalar cerrahi işlemlerden uzak tutulmalıdır (24).

Ayrıca, indometazin gibi prostaglandin sentez inhibitörlerinin, sedatiflerin, sempatomimetiklerin ve beta-blokerlerin kullanımının kısıtlanması önemlidir (1, 24).

B. Nonspesifik Tedaviler:

Pulmoner hipertansiyonlu hastalara, insitu trombozu azaltması ve sedanter yaşamlarından kaynaklı yüksek tromboemboli riskinin profilaksisi amacıyla; antikoagulan tedavi mutlaka önerilmelidir (1, 24, 25). Ancak, kanamaya eğilim oluşturuyor olmaları sebebiyle, senkop ve hemoptizi öyküsü olan hastalarda bu ilaçların dikkatle kullanılması gerekmektedir. Antikoagulan tedavi ajanı olarak warfarin kullanılabilir. Ancak INR düzeyinin 1.5-2.5 arasında tutulması hayati öneme sahiptir (24). Ayrıca; endotelin reseptör inhibitörü ve fosfodiesteraz inhibitörleriyle etkileşmesi sebebiyle bu ilaçlarla kombine kullanılması önerilmemektedir (24). Tüm bu nedenler göz önüne alındığında, bazı kaynaklar tarafından düşük molekül ağırlıklı heparinlerin kullanılmasının daha güvenli olacağı belirtilmektedir (1).

Bunun dışında PAH'lu hastalara diüretikler, tuz kısıtlaması, dijitalizasyon ve oksijen desteği de önerilmektedir (24, 25).

Tedavide nonselektif vazodilatör ajanların kullanılması büyük bir sorundur. Çünkü sistemik hipotansiyon kalp tarafından kompanse edilemeyeceğinden kardiyovasküler kollaps gelişebilmektedir (3).

C. Spesifik Tedaviler:

Günümüzde PAH patogenezinine yönelik spesifik tedavi seçenekleri de bulunmaktadır ve bu konuyla ilgili çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir (1, 21, 24, 26, 27). Pulmoner hipertansiyon tedavisinde halen kullanılmakta olan ve henüz araştırma aşamasında olan spesifik ilaç ve ajanlar aşağıdaki şekilde gruplanabilir:

1. Kalsiyum kanal antagonistleri (nifedipin, diltiazem, amlodipin) (1, 24, 25)
2. Prostanoidler (epoprostenol, treprostinil, iloprost) (4, 21, 24, 25, 26)
3. Endotelin reseptör antagonistleri (bosentan, sitaksentan) (4, 24, 25, 26)
4. Fosfodiesteraz (PDE) inhibitörleri (sildenafil, tadalafil) (4, 21, 24, 25, 26)
5. Tirozin kinaz inhibitörleri (PDGF, VEGF üzerinden)
6. Rho-kinaz inhibisyonu (fasudil) (4, 14, 21, 24, 25, 26, 27)
7. Statinler (simvastatin, pravastatin, rosuvastatin) (10, 21, 24, 25, 26)
8. Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP) (aviptadil) (4, 10, 24, 25, 26)
9. Serotonin transport inhibitörleri (fluoksatin, sertralin) (21, 24, 25, 26)
10. Kaveolin-1 peptidi (21)
11. Östradiol (21)
12. Serin elastaz inhibitörleri (M249314, ZD0892) (21)

Deneyimizin ana konusunu oluşturması sebebiyle; yukarıda sayılan tedavi seçenekleri arasından yalnızca tirozin kinaz inhibitörleri hakkında ayrıntılı bilgi aktarılacaktır.

Kronik pulmoner vasküler remodeling üzerine PDGF, VEGF, FGF, EGF gibi büyüme faktörlerinin etkisi gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır (4, 24, 26, 28). Böylece bu büyüme faktör reseptörlerinin inhibitörleri olan tirozin kinazların PAH tedavisinde kullanımıyla ilgili çalışmalar da artış göstermektedir (4, 24, 25, 26). Tirozin kinaz inhibitörleri esas olarak malignitelerin tedavisinde kullanılmakla beraber (örneğin PDGF reseptör inhibitörü olan imatinib klinikte kronik myeloid

lösemi ve GIS stromal tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır) yapılan çeşitli deneysel hayvan çalışmalarında bu maddelerin PAH'da da etkin olabilecekleri gösterildiğinden çalışmalar bu yöne doğru kaymıştır (25, 28). Tirozin kinaz inhibitörlerinin PAH tedavi seçenekleri arasında son yıllarda bu kadar popüler olmasının temel sebebi bu ilaçların deneysel modellerde “reverse-remodeling” özelliği göstermesidir (26). PDGF potent bir mitojendir ve pulmoner vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonunu uyarır (4, 21, 25). Özellikle PDGF reseptör antagonisti olan imatinib'in MCT ve kronik hipoksi ile oluşturulan PAH hayvan modellerinde sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir (10, 21, 24, 25, 26). Bu ilaç PAH tedavisi açısından Faz II'dedir (4). Yapılan bu faz II çalışmada imatinib'in pulmoner vasküler direnci iyileştirdiği ve kardiyak outputu arttırdığı gösterilmiştir (4, 24, 26). VEGF ise endotel hücreleri için önemli bir mitojen ve kemoatraktandır (4). VEGF'nin PAH patogenezindeki rolü henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır (4). VEGF, raf-1 ve PDGF reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib'in yapılan küçük (n=9) bir Faz Ib çalışmasında sağ ventrikül fonksiyonu, pulmoner hemodinamikler ve egzersiz kapasitesi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (4). Sorafenib; serin/treonin kinazları olan Raf-1 ve b-Raf'ın; ve ayrıca PDGF ve VEGF reseptör kinazlarının multikinaz inhibitörüdür (25, 28). Renal hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom tedavisinde onay almıştır (28). Klein ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada MCT ile oluşturulmuş PAH hayvan modelinde hem imatinibin hem de sorafenibin sağ ventrikül sistolik ve end-diastolik basınçlarında ve ayrıca Fulton indekslerinde anlamlı azalma sağladıkları gösterilmiştir (28).

Yukarıda tartışılmış olan mevcut tedavi seçeneklerinin hastalığın kontrol altına alınmasında yetersiz kalması sebebiyle son dönemde kombinasyon tedavileri de ön plana çıkmıştır. Şu anda klinik kullanımda olan ve halen çalışmaları süren pek çok kombinasyon seçeneği bulunmaktadır.

D. Alternatif Tedaviler:

Bu ilaç tedavileri dışında alternatif tedavi seçenekleri arasında gen tedavileri ve hücresel tedaviler de yer almaktadır. Gen tedavisine yönelik çeşitli hayvan çalışmaları yapılmış olmakla birlikte, klinik kullanıma girmiş bir genetik tedavi modalitesi henüz geliştirilememiştir (20). Ancak, bu tip deneysel çalışmalar

sayesinde PAH patogenezinin genetik açıdan aydınlatılması bakımından büyük gelişmeler kaydedilmiştir (20).

Akciğer transplantasyonu, medikal tedaviden yarar görmeyen hastalar için elimizde olan tek ve son tedavi seçeneğidir (1). Tek akciğer nakliyle bile pek çok hasta grubunda sağ kalp fonksiyonlarında anlamlı iyileşme kaydedilse bile, bu hastaların pek çoğunda; postop fırsatçı enfeksiyonlar, organ reddi ve obliteratif bronşiolitis gibi ciddi sorunlar görülebilmektedir (1). Buna ek olarak, nakil için uygun organ bulmak da önemli bir sorundur (1).

Yeni Tedavi Seçenekleri Niçin Gerekli?

Yukarıdaki tüm tedavi seçeneklerine rağmen; Amerika Birleşik Devletleri'nde, tedavi edilmeyen primer pulmoner hipertansiyonlu hastaların sağkalımı ortalama 2.8 yıldır (1, 7). Bu sağkalım süresi, pek çok malign hastalığından düşüktür. Mevcut veriler göstermektedir ki; hastanın sağkalımını belirleyen temel faktör; hastanın başlangıçtaki durumu değil, ilaca alınan yanıtıdır (1). Bu bulgular bir kez daha; PAH'nun ölümcül bir hastalık olduğunu ve tedavinin hastalığın prognozu üzerindeki kuvvetli etkisini ortaya koymaktadır.

İdiopatik ve sekonder PAH'nun patolojik ve klinik özellikler açısından çok benzer klinik tablolar olmaları sebebiyle; temel mekanizmaların aydınlatılmasıyla idiyopatik PAH için olduğu kadar sekonder PAH için de yeni ve daha başarılı tedavi seçenekleri ortaya konulabilecektir (1). Sekonder PAH'un idiyopatik PAH'dan çok daha sık görülmesi, altta yatan hastalıkların tedavisinin her zaman mümkün olmaması (örneğin; bağ dokusu hastalıkları, organ naklinin mümkün olmadığı veya zaman aldığı kronik akciğer, kalp ve karaciğer hastalıkları gibi), altta yatan hastalığın tedavisinin yapıldığı hallerde bile pulmoner arter basınçlarında yeterli normalleşmenin sağlanamaması (olasılıkla; vasküler remodelling gelişimi sebebiyle) ve gelişmiş olan sekonder PAH'un pek çok durumda mortaliteye olumsuz katkıda bulunuyor olması gibi nedenlerle sekonder PAH'da da etkin, kolay uygulanabilen ve ucuz tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmaktadır (1). Örneğin, bağ dokusu hastalıkları arasında yer alan sınırlı sklerodermada pulmoner hipertansiyon %40 oranında görülmektedir ve bu hastalıkta pulmoner hipertansiyon gelişimiyle kötü prognoz arasında anlamlı ilişki olduğu gösterilmiştir (1). Yine idiyopatik pulmoner

fibroziste pulmoner hipertansiyon gelişiminin prognozla doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (29). Sol kalp yetmezliği ve KOAH'ta da PAH ve sağ kalp yetmezliği mortalitenin kuvvetli prediktörleridir (5).

Tüm bu bilgiler bir arada değerlendirildiğinde; PAH'nun patogenezinin henüz yeterince aydınlatılmamış olması sebebiyle mevcut tedavi seçeneklerinin yetersiz kaldığı görülmektedir. Kullanılmakta olan pek çok tedavi seçeneğine rağmen, hastaların büyük bir kısmı tanıdan kısa bir süre sonra kaybedilmektedir.

Pulmoner Hipertansiyon Hayvan Modelleri:

Pulmoner hipertansiyonun etiolojisi net olarak ortaya konulmamış bir hastalık olması; buna bağlı olarak da, hastalığı geri döndürebilecek düzeyde etkin tedavi seçeneklerinin henüz bulunamamış olması sebebiyle bu hastalık araştırmaya oldukça açık bir alan oluşturmaktadır. Hastalığın ölümcül olması ve tahmin edilen 5 yıllık sağkalımın da oldukça düşük olması sebebiyle araştırmacılar bu konu üzerinde yoğun olarak çalışmaktadırlar. Hastalığın ağır klinik tablosu sebebiyle ayrıntılı invaziv girişimlerin yapılmasındaki kısıtlılıklar sebebiyle, hastalığın patogenezinin ilişkin çalışmalar için ancak postmortem örnekler kullanılabilir. Bu nedenle, hastalığın etiolojisi ve tedavisine yönelik ayrıntılı araştırmaların rahatlıkla yapılabilmesi amacıyla çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir.

Bunun yanında; özellikle bilinmesi gereken bir durum da şudur ki; PAH hayvan modelleri doğrudan insan PAH'unu yansıtmakta %100 gerçekçi değildir. Örneğin; son yıllarda yapılmış olan büyük klinik çalışma metaanalizlerinde mevcut pek çok ilacın insanlardaki semptomları ve hemodinamik parametreleri iyileştirdiği ancak sağkalıma etki etmediği gösterildiği halde; pek çok hayvan çalışmasında sağkalımı arttırdıkları yönünde bulgular elde edilmiştir (30). Hayvan çalışmalarında konstruksiyon ve neomuskularizasyonu azalttığı gösterilen bazı maddelerin insan PAH'unda pulmoner vasküler direnç üzerine benzer oranda olumlu etki göstermediği ortaya konulmuştur (30).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda kombine modellerin bazılarının insan PAH'unda görülenlere benzer şekilde "neointimal formasyon" oluşturabildiğinin gösterilmesi sebebiyle bu modellere yönelinmiştir. Bu modellerle

kısmi bir neointimal formasyon oluşmasına rağmen; rodentlerde tam anlamıyla bir pleksiform lezyon oluşumu gözlemlenmemektedir (30, 32).

Günümüzde yüzlerce PAH hayvan modeli mevcut olmasına rağmen en sık kullanılan modeller kronik hipoksi ve monokrotalin ile oluşturulan modellerdir (21, 31, 33).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Akciğer:

VEGF; 34-46 kd, ısı ve asitle kararlı, dimerik, heparin bağlayan bir glikoproteindir ve tüm anjiogenik faktörler arasında vasküler endotelyal hücrelere spesifik tek mediatördür (34, 35, 36). VEGF; TGF- β süper ailesinin bir üyesidir (37). VEGF ailesinde; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF gibi mediatörler bulunur (35, 36, 38, 39). VEGF, bir membran-reseptör tirozin kinazına bağlanarak ve böylece fosfolipaz C sinyal sistemini harekete geçirerek işlev görür (34, 40). VEGF'nin tanımlanmış olan reseptörleri VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (Flt-4)'dür (8, 10, 36, 37, 39, 41, 42, 43). VEGFR-1 ve 2 kan dolaşımında görevli iken, VEGFR-3 lenfatik dolaşımda bulunur (36, 39, 43). Vasküler endotel hücrelerinde bulunan temel reseptör VEGFR-2'dir ve anjiogenez, vasküler permeabilite, NO ve prostasiklin üretimi ile hücre proliferasyonu gibi temel işlevlerin çoğu VEGFR-2 üzerinden yürütülür (10, 35, 36, 43). VEGFR-1'in ise görevi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte VEGFR-2'nin işlevlerini düzenlediği düşünülmektedir (35).

VEGF, pek çok hücre ve doku tarafından salgılanmasına rağmen; özellikle akciğerdeki endotel hücreleri için mitojeniktir ve önemli bir sağkalım faktörüdür (10, 28, 29, 35, 36, 37, 42, 44). Bu etkilerini NO ve prostasiklin sentezi üzerinden gösterir (10, 29, 35). VEGF'nin anjiogenik özelliklerine ek olarak; vasküler permeabilite, kemik iliği, monosit kemotaksisi, immün ve antienflamatuar hücreler üzerine de pek çok etkisi mevcuttur (36, 38).

VEGF ayrıca bilinen en kuvvetli vasküler permeabilite arttırıcı mediatörlerden biridir. Vasküler permeabiliteyi histaminin 50.000 katı kadar arttırır (35, 39).

VEGF, embriyonik gelişimdeki vaskulogenezin ve erişkinlikteki anjiogenik sürecin en önemli düzenleyicisidir (10, 36, 39, 40). Özellikle yara iyileşmesi,

diabetik retinopati, romatoid artrit, psoriasis, enflamatuar hastalıklar, ateroskleroz, KOAH, PAH, IAH, akut akciğer hasarı ile tümör büyümesi ve metastazlarda anahtar rol oynamaktadır (35, 39, 40). Ancak bu hastalıkların patogenezinde ne şekilde ve ne yönde rol oynadığı henüz kesin olarak ortaya konulamamıştır.

VEGF geni kromozom 6p21.3'de yer alır (39). VEGF gen ekspresyonu; hipoksi, çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer bazı ekstrasellüler moleküller tarafından düzenlenir (39). Hipoksi maruziyetinin VEGF mRNA ekspresyonunu uyaran temel unsur olduğu ve bunu büyük oranda HIF-1 üzerinden yaptığı bilinmektedir (10, 13, 19, 29, 39, 45). Ancak, yapılan çalışmalar ortaya koymuştur ki, VEGF promoter bölgesi üzerinde, HIF-1 transkripsiyon bağlanma bölgesi dışında da bağlanma bölgeleri mevcuttur (39). VEGF promoter bölgesi üzerinde birden fazla bağlanma bölgesi bulunması hipoksi ve çeşitli büyüme faktörlerinin VEGF geni üzerinde sinerjistik etki gösterdiği yönünde yorumlanabilir. VEGF üretimini arttıran büyüme faktörleri arasında; epidermal büyüme faktörü (EGF), TGF- β , keratinosit büyüme faktörü (KGF), insulin benzeri büyüme faktörü (IGF) yer almaktadır (39). Bu faktörler VEGF salınımını parakrin ve otokrin olarak etkilerler (39). Bunlara ek olarak; VEGF ekspresyonunu arttıran major sitokinler IL-1 α ve IL-6'dır (39). Bunun dışında IL-10, IL-13, TSH, ACTH gibi pek çok mediatörün VEGF ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir (39).

Akciğerde VEGF ekspresyonunun çoğunu endotel hücreleri gerçekleştirmektedir (36, 41). İlginç olarak; VEGF'nin kendisi de endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyaran en kuvvetli mediatörlerden biridir (19, 36, 45). Bunun yanında VEGF, vasküler permeabilityi de artırır (19, 36, 45). VEGF'nin bu özellikleri; onun, onkogenezinde de etkili bir mediatör olmasını açıklar (19, 36). Böylece VEGF; hem normal, hem de patolojik anjioneogenezin temel mediatörlerinden biridir (36, 45).

VEGF ve PAH:

PAH patogenezinine yönelik olarak yapılmış olan pek çok araştırmanın sonucunda patogenezin temelinde endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi hücre gruplarının anormal proliferasyonunun ve bunların oluşturduğu endotel hücre tümörletlerinin yattığı gösterilmiştir (6, 37, 44). Prolifere olan endotel hücreleri

sıklıkla pleksiform lezyon denilen yapıları oluşturur (6, 44). Morfolojik olarak bu lezyon; muskuler pulmoner arter dalının anevrizmatik dilatasyonundan (50-300 µ çaplı) ve küçük damar ağından oluşmuş bir yapıdır (19). Bu proliferasyonun ana tetikleyici mekanizması tam olarak ortaya konulmamış olsa da büyüme faktörlerinin; özellikle de VEGF, PDGF ve TGF-β yolaklarının; proliferasyonun uyarılması ve sürdürülmesi sürecinde kilit rol oynadıkları gösterilmiştir (37).

Selimovic ve ark.'larının yapmış oldukları bir klinik çalışmada da bu bilgilerle paralel olarak; PAH'lu hastaların serum VEGF, PDGF-BB, TGF-β1 ve IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu gösterilmiştir (37).

VEGF ve PAH arasındaki ilişki ilk olarak, 1994'te Tudor RM ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (19). Bunu takip eden çalışmalarla hem idiopatik hem de sekonder PAH'da; pleksiform lezyonlardan VEGF ile birlikte; VEGFR-2, HIF-1α ve HIF-1β ekspresyonlarının da arttığı gösterilmiştir (4, 6, 15, 35, 37, 39, 44). Böylece, endotel hücrelerinin monoklonal ve lümen oblitere eden büyümeleriyle karakterize bozulmuş anjiogenezin bir göstergesi olan pleksiform lezyonların PAH patogenezinde kilit bir role sahip olduğu anlaşılmıştır (10, 35, 39). VEGF pleksiform lezyonlar dışında; endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, tip II pnömositler ve aktive alveoler makrofajlar tarafından da üretilir (10, 35). Buradan hareketle, VEGF'nin tüm bu hücre gruplarının gelişiminde önemli bir mediatör olduğu düşünülebilir (35).

VEGF üretiminin temel uyararı hipoksi ve iskemidir (41, 42). Hipoksik ve/veya iskemik koşullarda hem VEGF'nin hem de reseptörlerinin upregüle olduğu bilinmektedir (41). VEGF'nin kronik hipoksi ile ilişkili pulmoner vasküler remodelingin temel modulatörü olduğu da bilinmektedir (35). Hem akut hem de kronik hipokside VEGF'nin kendisinin ve reseptörlerinin üretiminde artış olmaktadır (8, 10). PAH'da da, VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (8, 10). VEGF'nin PAH'taki bozulmuş anjiogenik yanıt, endotel hücrelerinin klonal çoğalması ve pleksiform lezyonların oluşmasıyla yakından ilişkili olduğu da gösterilmiştir (8, 10).

Yukarıda ayrıntılı olarak açıklanmaya çalışılan tüm bu sürecin odağında bulunan patolojik lezyonlar olan pleksiform lezyonların; hem idiopatik hem de sekonder PAH'un ortak lezyonları olması sebebiyle; VEGF ve ilişkili

mekanizmaların PAH'ın neredeyse tüm alt tipleri için ortak mekanizmalar olduğu akıldan çıkarılmamalıdır.

Bevacizumab:

Bevacizumab, selektif olarak VEGF'ye bağlanarak bu mediatörün biyolojik aktivitesini nötralize eden rekombinant humanize monoklonal IgG1 antikorudur (46). Böylece, anjiogenez ve dolayısıyla vaskülarizasyon inhibe olmuş olur. Bu önemli özelliği sebebiyle malignitelerin büyümesinin kontrol altına alınması ve metastazların önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (46). İlk olarak kolon ve rektum kanserlerinin birinci sıra tedavisi için FDA onayı almıştır (5-florourasil ile kombine olarak kullanılmak üzere) (46). Bu tarihten sonra çeşitli kombinasyon tedavilerinin parçası olarak FDA onayları almıştır. Günümüzde başta GIS maligniteleri olmak üzere pek çok malignite türünde FDA onayı mevcuttur ve dünyanın pek çok ülkesinde bu endikasyonlarla kullanılmaktadır (38, 46). Bevacizumab aynı zamanda ileri evre/metastatik NSCLC için de FDA onayı almış bir ilaçtır ve pek çok ülkede bu endikasyonla kullanılmaktadır (38, 46). Oldukça güvenilir bir ilaç olmasına rağmen; bu ilacı kullanan malignite hastalarında çeşitli yan etkiler bildirilmiştir. Bunlar arasında en sık görülenleri; kemik iliği supresyonu, halsizlik, karın ağrısı, bulantı, kusma, diare, konstipasyon, stomatit, sistemik hipertansiyon, venöz tromboemboli, nötropenik ateş, pulmoner enfeksiyonlarda artış, hiponatremi, başağrısı, proteinüridir (38, 46). İlacın pulmoner dolaşıma olan temel etkileri özetle; üst havayolu enfeksiyonlarında artış,, epistaksis, alt havayolu enfeksiyonlarında artış, dispne, artmış hemoraji eğilimine ikincil hemoptizi, artmış tromboemboli eğilimi, sistemik hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğidir (38, 46). İlaça bağlı tedavi gerektiren pulmoner hemoraji oranı %2.3'tür (46). Bevacizumab'ın 66 hastalık bir Faz 2 çalışmasında hayatı tehdit edici pulmoner hemoraji görülme oranı %9 olarak saptanmıştır (38). Çalışmaya katılan 66 hastanın 4'ü masif pulmoner hemoraji sebebiyle kaybedilmiştir (38). Bevacizumab'lı kemoterapi rejimi alan hastalarda diğer bevacizumabsız kemoterapi rejimi alanlara göre kanama riski 5 kata kadar artmıştır (38). Literatürde bevacizumab'ın pulmoner vasküler sistem üzerine olan etkilerine (olumlu etkiler ve/veya yan etkiler) ilişkin bir deneysel veya klinik çalışma bulunamamıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM:

Tüm deneysel işlemler için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Proje No: 39/2009) (İzmir, Türkiye).

Deneylerde 200-250 mg arası erişkin Wistar-albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır (11, 45). Deney süresince hayvanların tümü ad libitum beslenmiştir ve aynı gündüz-gece döngüsüne maruz bırakılmıştır. 0. günde tartılan hayvanlar, her grupta 6'şar adet hayvan (11, 47) olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır;

Grup 1 (Salin Kontrol Grubu) (n=6): 0.günden itibaren oda havası soluyan sıçanlara 5. günde %0.9 serum fizyolojik i.p uygulaması yapılmış ve 8. günde sıçanlar gerekli ölçümler yapıldıktan sonra sakrifiye edilmişlerdir.

Grup 2 (Bevacizumab Kontrol Grubu) (n=6): 0. günden itibaren oda havası soluyan sıçanlara 5. günde 1mg/kg dozunda bevacizumab i.p uygulaması yapılmış ve 8. günde sıçanlar gerekli ölçümler yapıldıktan sonra sakrifiye edilmişlerdir.

Grup 3 (PAH Kontrol Grubu) (n=6): 0.günden itibaren %10 oksijen ve %90 azot karışımına maruz bırakılan sıçanlara 5. günde %0.9 serum fizyolojik i.p uygulaması yapılmış ve 8. günde sıçanlar gerekli ölçümler yapıldıktan sonra sakrifiye edilmişlerdir.

Grup 4 (PAH + Bevacizumab Grubu) (n=6): 0.günden itibaren %10 oksijen ve %90 azot karışımına maruz bırakılan sıçanlara 5. günde 1mg/kg dozunda bevacizumab i.p uygulaması yapılmış ve 8. günde sıçanlar gerekli ölçümler yapıldıktan sonra sakrifiye edilmişlerdir.

Kronik hipoksi uygulaması ; 110 x 56 x 35 cm boyutlarındaki toplam 215 lt hacmindeki cam fanusa; %10 oksijen ve %90 azottan oluşan gaz karışımının, 2 lt/dakika hızında günde 23 saat süreyle ve 8 gün boyunca verilmesi yoluyla yapılmıştır (41, 42, 45, 47, 48, 49) . Günlük olarak iki kez, her biri yaklaşık 30 dakika sürecek şekilde fanus açılmıştır (42, 45, 47, 48). Böylece hayvanların kafes temizlikleri ile yem ve su takviyeleri yapılmıştır (42, 45, 47, 48).



A



B

Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarından örnekler (A: Oda havasında bulunan kontrol grupları; B: Özel düzenek içinde %10 oksijen ve %90 azot gaz karışımına maruz bırakılan deney grupları)

Fanus içindeki oksijen, karbondioksit ve azot miktarları günde 3 kez anestezi gaz monitörü ile (Anesthetic Gas Monitor Type 1304, Brüel & Kjaer®) ölçülerek kaydedilmiştir (42, 45, 47, 48, 49). İç ortam oksijen oranı %10-15 arasında ve karbondioksit oranı < %0.2 olacak şekilde gerekli ayarlamalar yapılmıştır (47). Ortalama oda içi sıcaklığı 22-24 C'de tutulmuştur (45, 48).



Şekil 2: Deney düzeneğine bağlı halde olan anestezi gaz monitörü ile iç ortam oksijen ve karbondioksit ölçümlerinin yapılması

Fanusun tabanına, fanus havasındaki fazla karbondioksit ve nemi bağlaması amacıyla soda lime serpilmiştir (42, 45, 48, 49). Soda lime maddesi günlük olarak değiştirilmiştir.



Şekil 3: Deney düzeneği (fanus) içinde soda lime granüllerinin kullanılması (A: Fanus tabanına serpilmiş olan soda lime granüllerinin görünümü; B: Soda lime granüllerinin iç ortam havasındaki karbondioksit moleküllerini bağladıktan sonra renginin beyazdan açık mora dönüşmesi)

Hayvanlar günlük olarak tartılmış, solunum paternleri, oral alım miktarları ve kalp hızları gözlenmiştir. Deneyin 5. günde Grup 2 ve Grup 4'teki sıçanlara %0.9 serum fizyolojik ile hazırlanmış olan bevacizumab'dan kilo başına hesaplandıktan sonra 1 mg/kg dozunda i.p. uygulama yapılmıştır. Grup 1 ve Grup 3'teki sıçanlara ise aynı hacimde %0.9 serum fizyolojik yine i.p. olarak uygulanmıştır.



Şekil 4: Bevacizumab ve SF uygulaması (A: Hayvanlar tek tek tartıldıktan sonra, kilo başına almaları gereken bevacizumab dozunun hazırlanması; B: Uygun bevacizumab dozunun veya SF'in i.p. olarak uygulanması)

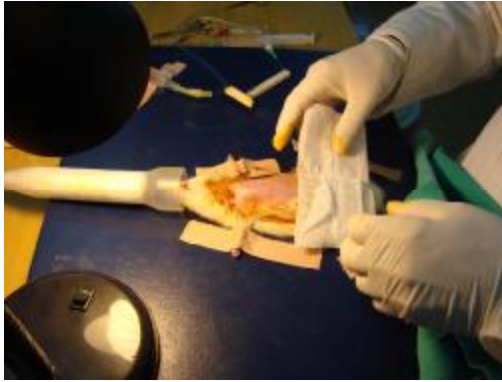
Deneyin 8. gününde tüm gruptaki sıçanlar tartıldıktan sonra 5 mg/kg ksilazin i.p ve 35 mg/kg ketamin i.p uygulamaları yapılarak anestezi sağlanmıştır (11, 45, 47, 50, 51, 52). Genel anestezi altında torakotomi yapılan sıçanların kalplerinden doğrudan basınç ölçümleri yapılmıştır.



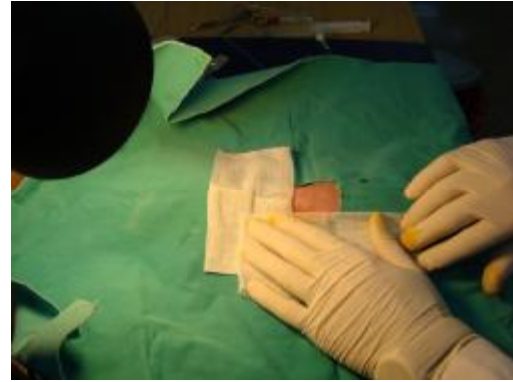
A



B



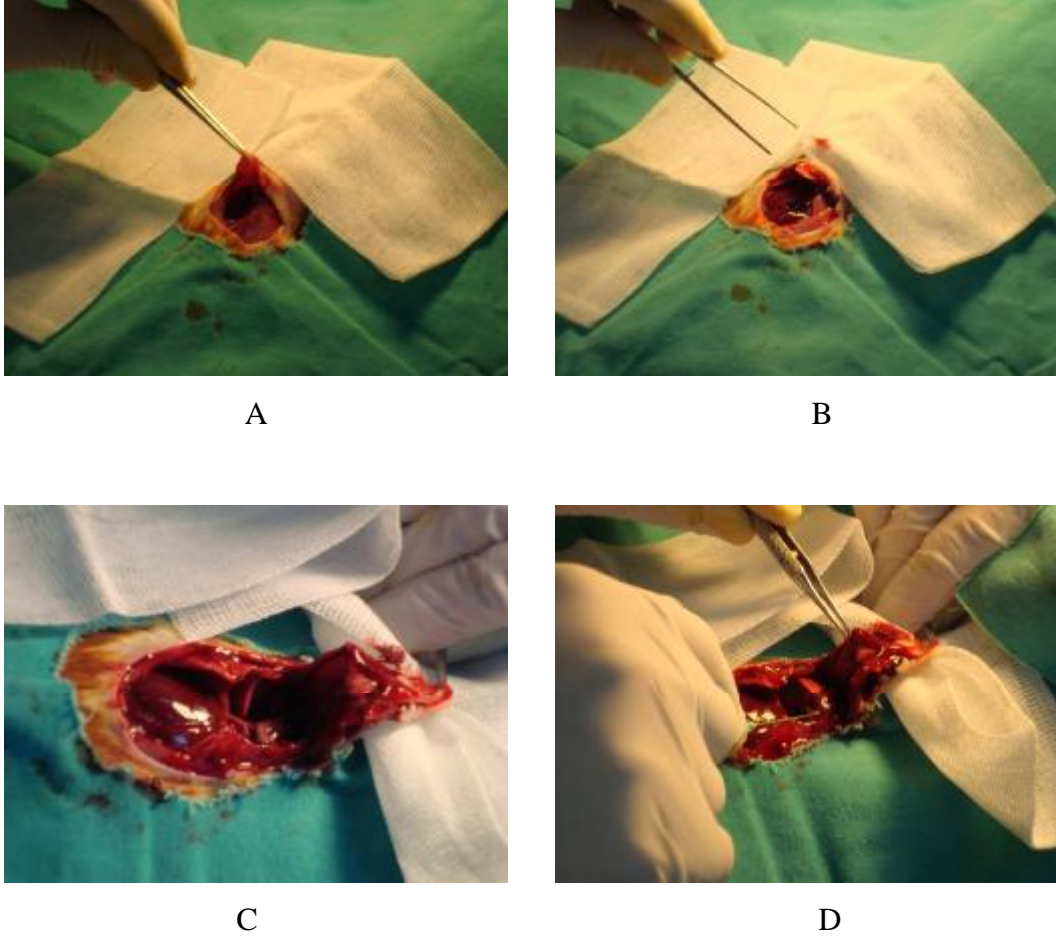
C



D

Şekil 5: Hayvanların genel anesteziye alınmaları ve operasyon hazırlığı (A: Hayvanların kilolarına uygun dozda ketamin ve ksilazinin i.p. olarak uygulanması; B: Operasyon bölgesinin traş edilmesi; C: Operasyon bölgesinin temizlenmesi; D: Sterilitenin sağlanması)

20 G branül ile önce sağ ventriküle girilerek sağ ventrikül ortalama basıncı (pulmoner arter basıncını yansıtır) kaydedildikten sonra hemen ardından sol ventriküle girilerek sol ventrikül sistolik basıncı (sistemik arter basıncını yansıtır) kaydedilmiştir. Basınç ölçümleri Petaş KMA 250 basınç transdüseri ve kaydedici sistemi® ile yapılmıştır.



Şekil 6: Anterior torakotomi yaklaşımıyla kalbe ulaşılması ve doğrudan intrakardiyak ölçümlerin yapılması (A-D: işlem basamakları)

Son dönem pulmoner hipertansif sıçanlarda; pulmoner arter kateterizasyonu yapmak teknik olarak mümkün olmadığından (9) (ciddi artmış pulmoner arter basınçları sebebiyle kateterin pulmoner artere yerleştirilmeye çalışılması halinde mortalite olasılığının yüksek olması ve kateterin doğru yere yerleştirildiğinin skopi altında kontrolünün zorunlu olması sebebiyle) doğrudan intrakardiyak ölçüm yöntemi tercih edilmiştir. Deney prosedürü gereği, basınç ölçümleri sonrası gerekli örnekler alındıktan sonra hayvanların sakrifiye edilmeleri planlandığından intrakardiyak ölçüm yapılmasında teknik olarak bir sakınca görülmemiştir.

Basınç kayıtları tamamlandıktan sonra her bir sıçandan yaklaşık 5 cc tam vücut kanı intrakardiyak ponksiyon ile alınmış ve hayvanlar bu yolla sakrifiye edilmişlerdir (29, 42). Sakrifikasyondan hemen sonra sıçanların kalp ve her iki akciğerleri alınmıştır.



A



B

Şekil 7: Basınç ölçümleri sonrası kan ve akciğer örneklerinin alınması (A: Basınç ölçümleri; B: Kan ve doku örneklerinin korunması için işlem öncesi hazırlanmış olan malzemeler)

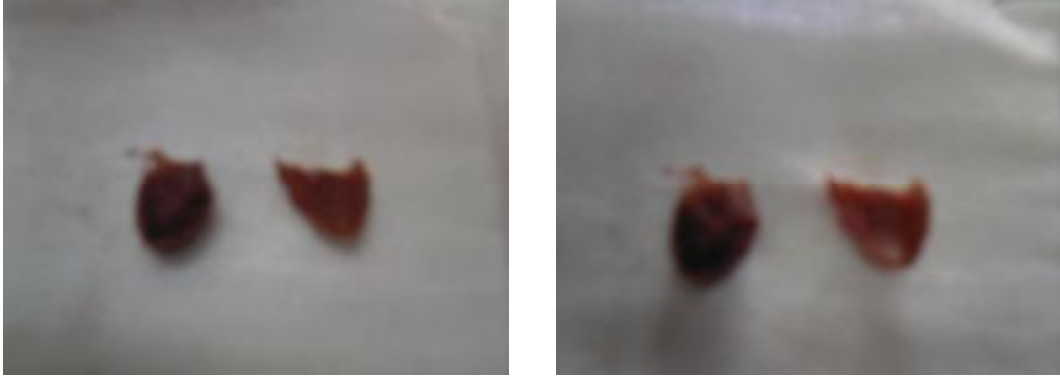
Alınan tam vücut kanları 3000 devir/saniye hız ile 10 dakika santrifüje edilerek serumları ayrılmış ve bu serumlar kodlandıktan sonra, buzdolabında -80 °C'de VEGF serum ELISA testlerinin yapılacağı güne kadar muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 8: Serum örneklerinin santrifüj işlemiyle elde edildikten sonra - 80 °C buzdolabında saklanması

Alınmış olan akciğerler %10 formolin ile yıkanmış ve böylece fikse edilmişlerdir (29, 41, 48). Kalp dokularında ise Fulton index ölçümleri yapılmıştır. Fulton indeks ölçümü için sağ ventrikül duvarı sol ventrikül ve septumdan ayrılmıştır (9, 11, 28, 41, 45, 50, 51, 52). Daha sonra hem sağ ventrikül hem de sol ventrikül ve septum dokuları hassas terazi ile tartılmışlardır (9, 11, 28, 41, 45, 50, 51, 52). Bu

ağırlıklar ile [sağ ventrikül ağırlığı/sol ventrikül +septum ağırlığı] oranları kaydedilmiştir (9, 11, 28, 41, 45, 50, 51, 52). Bu işlem tamamlandıktan sonra kalp dokuları da formolin ile fikse edilmiştir.



Şekil 9: Fulton indeks ölçümü için sağ ventrikülün septum ve sol ventrikülden ayrılması

Fikse edilen kalp ve akciğer dokuları 24 saat içinde patoloji laboratuvarında işlemlenmiştir. Boyamalar öncesi dokular parafine gömülmüş ve 5 µm'lik kesitler alınmıştır. Sonrasında hematoksin&eosin boyası ve VEGF antikoruna (ab46154_Abcam@_MA_USA) ile 1/200 dilusyonda, akciğer doku immunohistokimyası yapılmıştır. Hematoksin&eosin boyaması yapılmış olan kesitlerde küçük pulmoner arterler (çap<100 µm) x40 büyütmede incelenmiştir (9, 11, 17, 29, 50, 53). Her bir hayvan için 25'er adet küçük pulmoner arter rastlantısal olarak incelenmiş ve kaydedilmiştir (17, 54). Her bir pulmoner arterin muskularis mukoza tabakasının kalınlığı (Medial Kalınlık = MK) morfometrik olarak ölçülmüştür (29, 41, 45, 53). Buna ek olarak yine her bir damar için, eksternal çapın morfometrik ölçümü de yapılmıştır (29, 41, 45, 53). Daha sonra medial kalınlık / eksternal çap (eksternal elastik laminalar arası uzaklık) oranları hesaplanarak bu değerlerin %'lik değere çevrilebilmesi için her bir değer 100 ile çarpılmış ve böylece Media Kalınlık % (MK%) değerleri elde edilmiştir. VEGF antikor boyaması yapılmış olan kesitlerde de yine 25 adet pulmoner arter rastlantısal olarak x40 büyütmede incelenmiş ve boyanma kriteri olarak VEGF doku skoru kullanılmıştır. Bu skorun elde edilebilmesi için her bir pulmoner arter endotelinin VEGF antikoruna ile boyanma yoğunluğu ve boyanma yüzdeleri değerlendirilmiştir (29, 55). Boyanma yoğunluğu için; zayıf yoğunlukta boyanma = 1, orta yoğunlukta boyanma = 2,

kuvvetli yoğunlukta boyanma =3 olacak şekilde puanlama yapılmıştır (29, 55). Boyanma olmayan arterlere 0 puan verilmiştir (29, 55). Boyanma yüzdesi için ise; <%10 boyanma = 1, <%50 boyanma = 2, <%90 boyanma = 3 ve %100 boyanma = 4 puan verilmiştir (29, 55). Her bir damarın VEGF doku skoru için boyanma yoğunluk ve boyanma % skorları toplanarak damar VEGF skorları elde edilerek kaydedilmiştir (29, 55). Tüm bu patolojik işlemler, kesitlerin hangi hayvana ve hangi deney grubuna ait olduğunu bilmeyen bir patolog tarafından yapılmıştır (kör çalışma tekniği ile). Sonrasında her bir hayvana ait 25'er damarlık morfometrik ölçümler (MK ve MK%) ile immunohistokimya ölçümlerinin (doku VEGF skoru) ortalamaları ve SEM değerleri hesaplanarak gerekli istatistikler yapılmıştır.

Sıçanlara ait serum örnekleri; Invitrogen® (CA_USA) Rt VEGF kiti ile solid faz sandviç ELISA (Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile çalışılarak 450nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

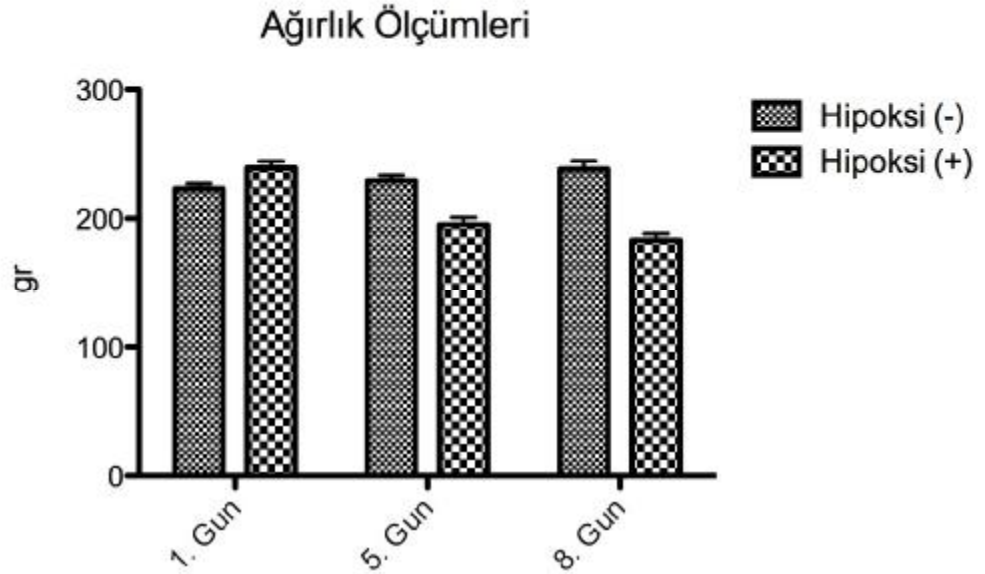
Tüm bu deneyler ve işlemler sonucunda elde edilmiş olan veriler SPSS 15.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Değerler ortalama \pm SEM olarak belirtilmiş; ikili gruplar arası karşılaştırmalarda Student's *t* testi ve çoklu grup karşılaştırmaları için iki yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. P değerinin 0.05'in altında olduğu farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir.

SONUÇLAR:

Kilo Takipleri:

Hipoksi uygulanan grubun (n=12) 1. gündeki ortalama ağırlığının 239.33 ± 5.08 gr olduğu ve bu değer hipoksi uygulanmayan grup için (n=12) 223.17 ± 3.85 gr olduğu görülmüştür. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.009$). Benzer şekilde; 5. gün tartıları 195 ± 5.82 gr ve 229.25 ± 4.34 gr ($p < 0.0001$); ve 8. gün tartıları; 183.17 ± 5.09 gr ve 238.33 ± 6.42 gr'dır ($p < 0.0001$).

Şekil 10'da da görüldüğü üzere hipoksik olmayan grubun ortalama ağırlıkları deney başlangıcından itibaren artmaktayken; hipoksik grubun ağırlık ortalamalarında deney süresince istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ($p < 0.0001$).



Şekil 10: Hayvanların 1., 5. ve 8. gündeki kilo takipleri

Hipoksi uygulanmış olan hayvanlardan bevacizumab uygulanmış olanların (n=6) 1. gündeki ağırlık ortalamaları 227.83 ± 6.16 gr iken; bevacizumab uygulanmamış olanların (n=6) 1. gündeki ağırlık ortalamaları 250.83 ± 4.76 gr olarak ölçülmüştür ($p=0.007$). Aynı grupların 5. gün tartıları 181.83 ± 5.60 gr ve 208.17 ± 6.95 gr ($p=0.007$); 8.gün tartıları 172 ± 5.65 gr ve 194.33 ± 5.67 gr ($p=0.01$) olarak ölçülmüştür.

Hipoksi uygulanmamış olan hayvanlardan bevacizumab uygulanmış olanların (n=6) 1. gündeki ağırlık ortalamaları 215 ± 4.47 gr iken; bevacizumab uygulanmamış olanların (n=6) 1. gündeki ağırlık ortalamaları 231.33 ± 4.32 gr olarak ölçülmüştür (p=0.01). Aynı grupların 5. gün tartıları 220.33 ± 6.18 gr ve 238.17 ± 3.58 gr (p=0.02); 8.gün tartıları 233 ± 12.59 gr ve 243.67 ± 3.35 gr (p=0.22) olarak ölçülmüştür.

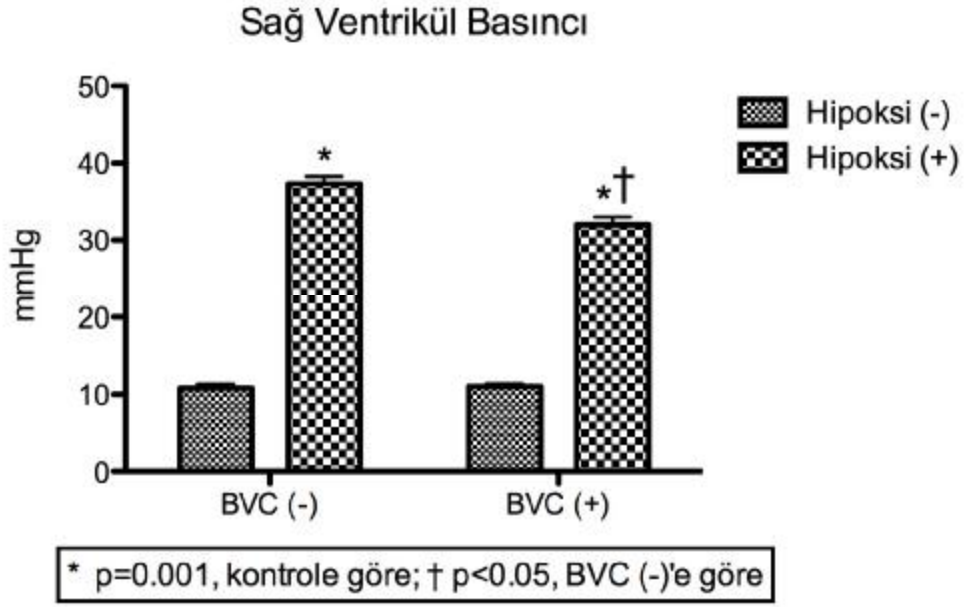
Hemodinamik Ölçümler:

Sağ ventrikül ortalama basınçları (RVPm) hipoksi uygulanmayan grupta (n=12) 10.92 ± 0.29 mmHg iken; hipoksi uygulanan grupta (n=12) 34.67 ± 1.05 mmHg olarak ölçülmüştür. Hipoksi uygulaması yapılmış olan tüm deney hayvanlarında, RVPm anlamlı olarak artış göstermiştir (p<0.0001).

Hipoksi uygulanan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) RVPm 37.33 ± 0.95 mmHg iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 32.00 ± 1.03 mmHg olarak ölçülmüştür. Bevacizumab uygulaması kronik hipoksi modelinde RVPm ölçümlerini anlamlı ölçüde azaltmıştır (p=0.002).

Hipoksi uygulanmayan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) RVPm 10.83 ± 0.48 mmHg iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 11.00 ± 0.37 mmHg olarak ölçülmüştür. Söz konusu fark istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine erişmemiştir (p=0.4).

Özetle, Şekil 11'de de rakamsal olarak ifade edildiği üzere; hipoksik grupların sağ kalp basınçları hipoksik olmayanlara göre anlamlı olarak yüksektir (p<0.0001). Ayrıca; hipoksik olmayan gruplar arasında BVC uygulaması ile sağ kalp basınçlarında anlamlı farklılık elde edilememekle birlikte; hipoksik gruplar arasında BVC uygulanan grubun sağ kalp basınçlarının BVC uygulanmayan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır (p=0.002).

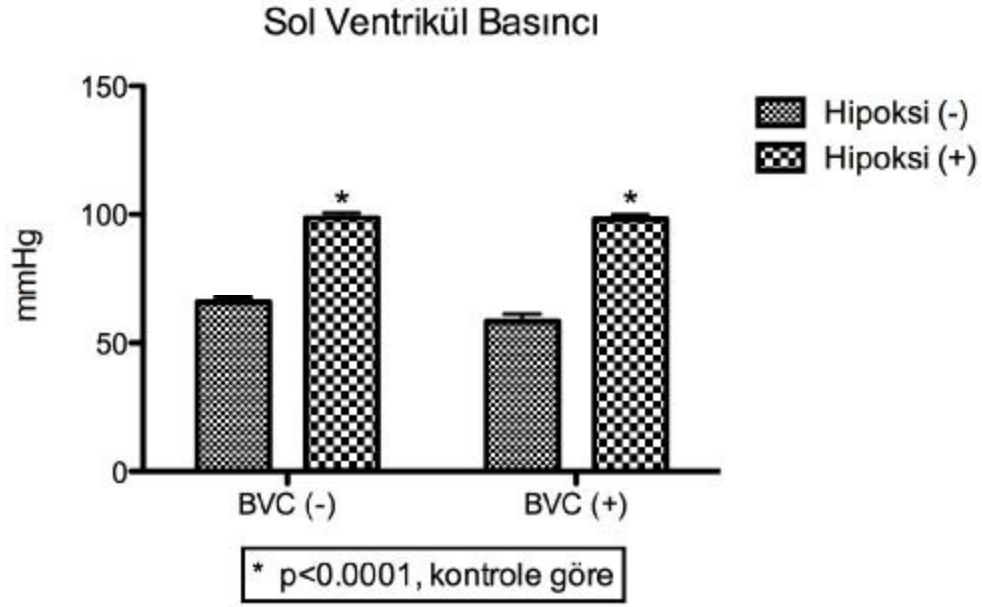


Şekil 11: Sağ ventrikül basınçlarının hipoksi ve bevacizumab uygulaması ile ilişkisi

Sol ventrikül sistolik basınçları (LVPs) hipoksi uygulanmayan grupta (n=12) 98.42 ± 1.33 mmHg iken; hipoksi uygulanan grupta (n=12) 61.92 ± 1.93 mmHg olarak ölçülmüştür. Hipoksi uygulaması LVPs değerlerini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0.0001$).

Hipoksi uygulanan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) LVPs 65.50 ± 1.95 mmHg iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 58.33 ± 2.73 mmHg olarak ölçülmüştür. Bevacizumab uygulaması kronik hipoksi modelinde LVPs ölçümlerini anlamlı ölçüde azaltmıştır ($p=0.03$).

Hipoksi uygulanmayan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) LVPs 98.67 ± 2.03 mmHg iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 98.17 ± 1.90 mmHg olarak ölçülmüştür. Söz konusu fark istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine erişmemiştir ($p=0.43$).



Şekil 12: Sol ventrikül basınçlarının hipoksi ve bevacizumab uygulaması ile ilişkisi

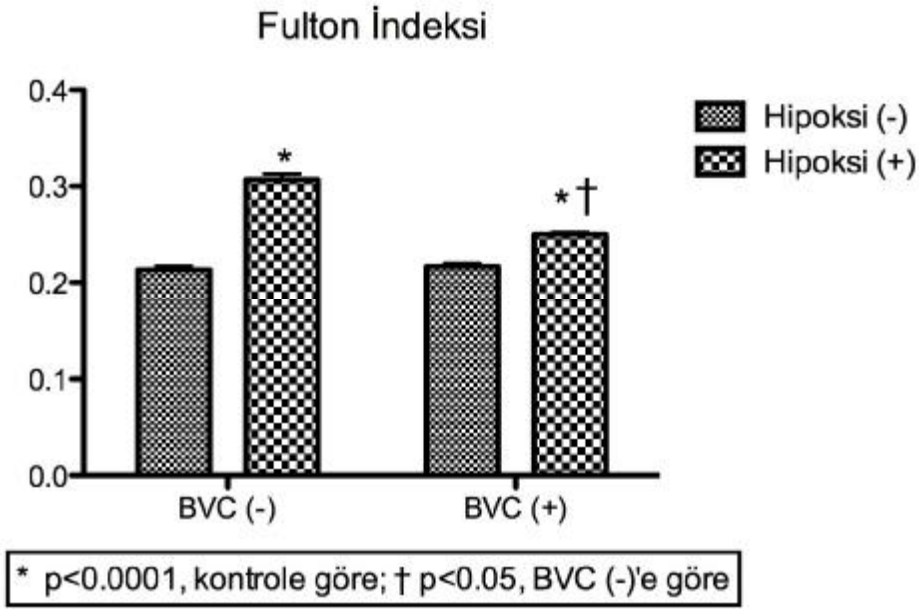
Sağ Ventrikül Hipertrofisi:

Sağ ventrikül/Septum + Sol ventrikül Oranı (Fulton indeksi) hipoksi uygulanmayan grupta (n=12) 0.22 ± 0.01 iken; hipoksi uygulanan grupta (n=12) 0.28 ± 0.01 olarak ölçülmüştür. Hipoksi uygulaması deney hayvanlarında Fulton İndeksi'ni istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırmıştır ($p < 0.0001$).

Hipoksi uygulanan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) Fulton İndeksi 0.31 ± 0.01 iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 0.25 ± 0.01 olarak ölçülmüştür. Hipoksi ile artmış Fulton İndeksi'ni bevacizumab uygulaması anlamlı ölçüde düşürmektedir ($p < 0.0001$).

Hipoksi uygulanmayan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grupta (n=6) Fulton İndeksi 0.21 ± 0.00 iken; bevacizumab uygulanan grupta (n=6) 0.22 ± 0.00 olarak ölçülmüştür. Bu fark, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0.27$).

Şekil 13'te görüldüğü üzere; hipoksik gruplarda Fulton indeksi hipoksik olmayan gruplara göre anlamlı ölçüde yüksektir ($p < 0.0001$). Hipoksik grup içinde ise; BVC uygulamasının Fulton indeksini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürdüğü gösterilmiştir ($p < 0.05$).

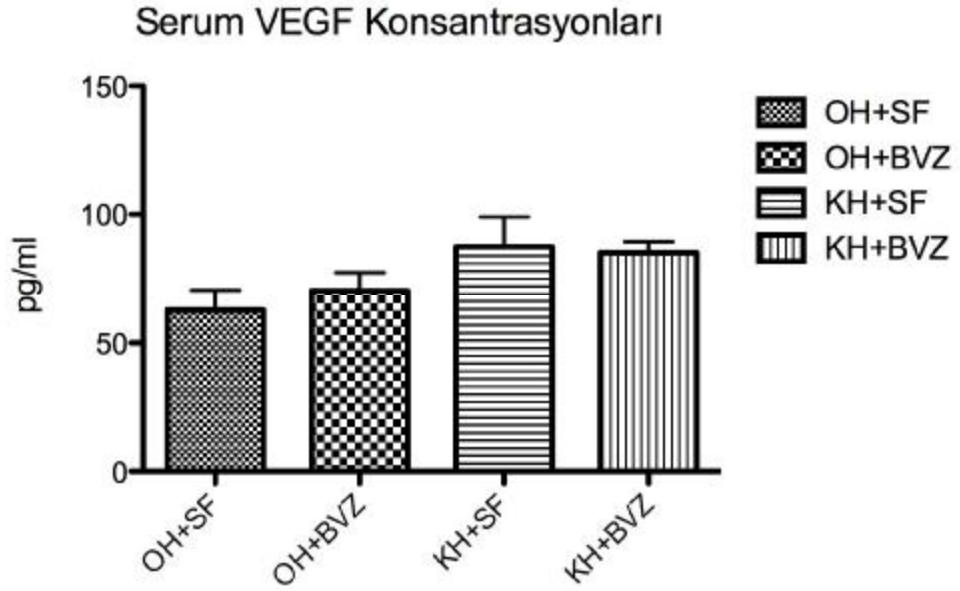


Şekil 13: Fulton indekslerinin hipoksi ve bevacizumab uygulamaları ile ilişkisi

Serum VEGF Düzeyleri:

ELISA yöntemiyle ölçülen serum VEGF düzeyleri sırasıyla oda havası + SF grubunda 62.71 ± 7.72 pg/mL; oda havası + bevacizumab grubunda 70.19 ± 7.19 pg/mL; kronik hipoksi + SF grubunda 87.42 ± 11.58 pg/mL; kronik hipoksi + bevacizumab grubunda 85.01 ± 4.45 pg/mL'dir.

Oda havası + SF grubu ile kronik hipoksi + SF grubu arasında serum VEGF düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.05$). Benzer şekilde oda havası + bevacizumab grubu ile kronik hipoksi + bevacizumab grubu serum VEGF düzeyleri açısından da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0.05$). Ancak; kronik hipoksi uygulanan hayvanlar içinde bevacizumab uygulanan ve uygulanmayan grupların serum VEGF düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p= 0.42$).

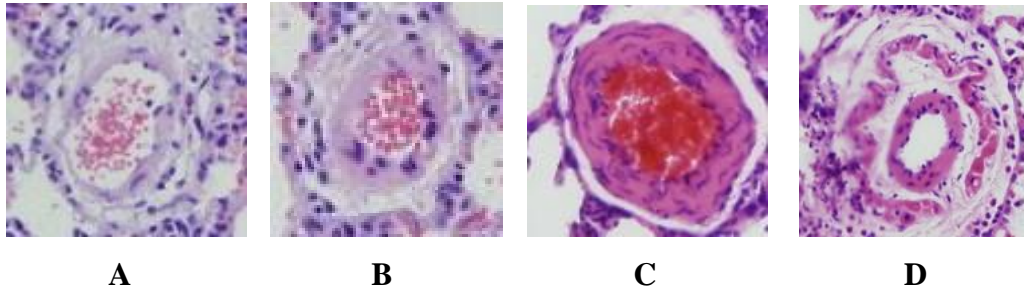


Şekil 14: Serum VEGF konsantrasyonlarının gruplara göre dağılımı

Pulmoner Arter Morfometrik Ölçümleri ve İmmunohistokimyasal Analiz Sonuçları:

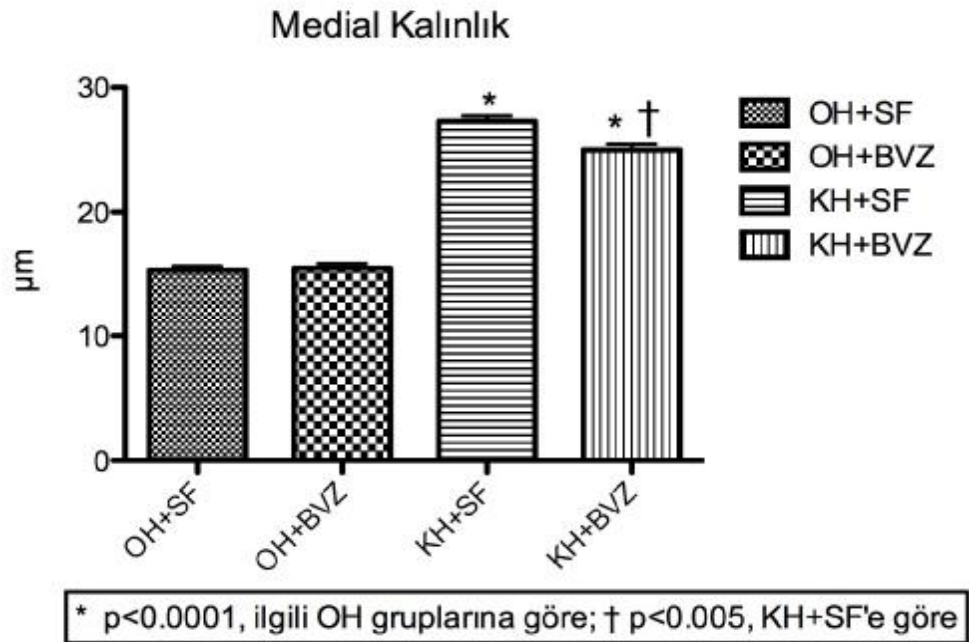
Küçük pulmoner arterlerde iki tip morfometrik ölçüm yapılmıştır. Bunlardan birincisi muskularis mukoza tabakasının (MK) μm cinsinden kalınlığının ölçülmesi; ikincisi ise muskularis mukoza tabakası kalınlığının eksternal damar çapına bölünmesi ve sonrasında 100 ile çarpılmasıyla elde edilen MK% değeridir.

Ölçülen MK değerlerinin grup ortalamaları sırasıyla; oda havası + SF grubu için $15.33 \pm 0.33 \mu\text{m}$; oda havası + bevacizumab grubu için $15.49 \pm 0.37 \mu\text{m}$; hipoksi + SF grubu için $27.30 \pm 0.41 \mu\text{m}$; hipoksi + bevacizumab grubu için $24.97 \pm 0.51 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 15: Küçük pulmoner arterlerin hematoksilin & eosin boyamaları (x40 büyütmede) (A: normal pulmoner arter; B: muskuler tabakasında ılımlı kalınlaşma gelişmiş bir pulmoner arter; C: Muskuler tabakasında belirgin kalınlaşma gelişmiş bir pulmoner arter; D: çift muskuler tabakası olan bir pulmoner arter)

Oda havası + SF grubunun MK değeri ile hipoksi + SF grubunun MK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0.0001$). Hipoksi + SF grubuyla hipoksi + bevacizumab grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p = 0.002$). Ayrıca; oda havası + SF grubuyla hipoksi + bevacizumab grubu arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.0001$).



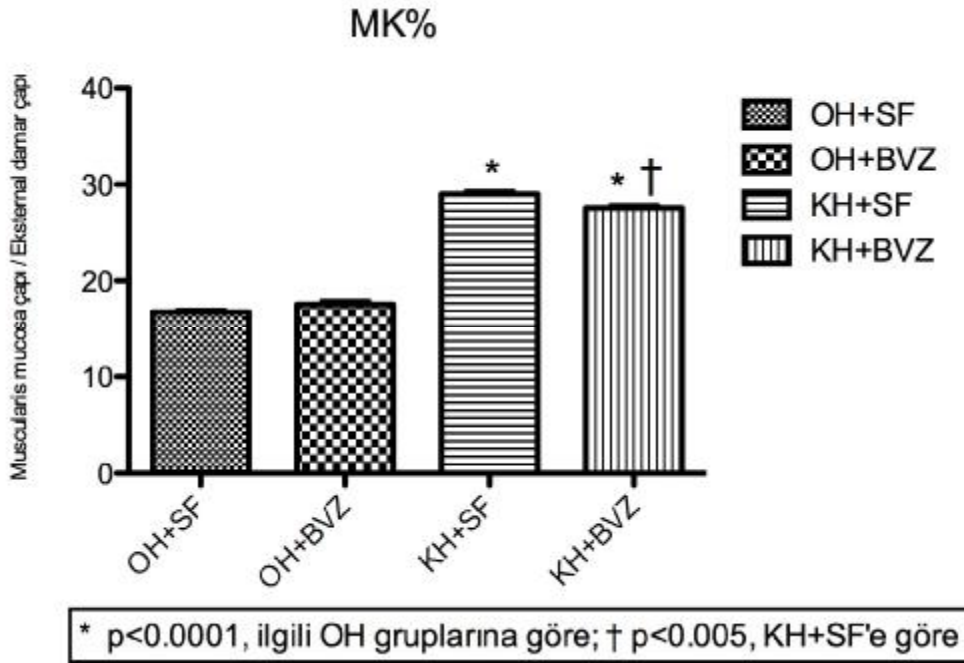
Şekil 16: Medial kalınlık (MK) değerlerinin gruplara göre dağılımı

Şekil 16'da gösterildiği üzere; hipoksik grupların MK değerleri hipoksik olmayan gruplara göre anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0.0001$). Bunun yanında; hipoksik gruplar arasında, BVC uygulaması ile MK değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p<0.05$).

Gruplar arası MK% değerleri de MK değerleriyle paralel bir ilişki göstermektedir. Ölçülen MK% değerlerinin grup ortalamaları sırasıyla; oda havası + SF grubu için 16.76 ± 0.26 ; oda havası + bevacizumab grubu için 17.54 ± 0.39 ; hipoksi + SF grubu için 29.00 ± 0.33 ; hipoksi + bevacizumab grubu için 27.54 ± 0.29 olarak ölçülmüştür.

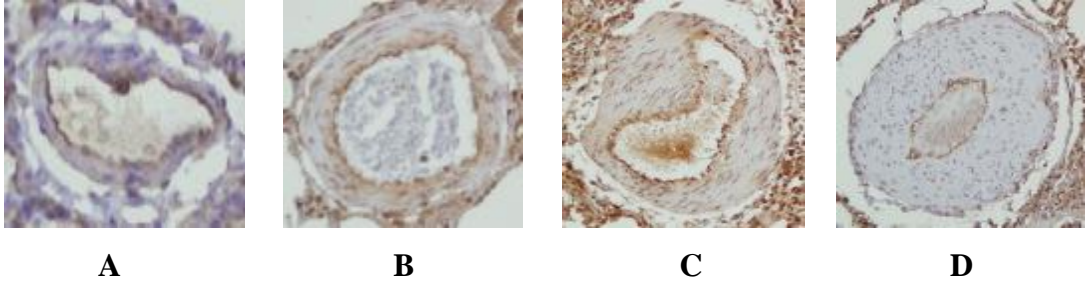
Oda havası + SF grubunun MK% değeri ile hipoksi + SF grubunun MK% değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0.0001$). Hipoksi + SF grubuyla hipoksi + bevacizumab grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p = 0.004$). Ayrıca; oda havası + SF grubuyla hipoksi + bevacizumab grubu arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.0001$).

Şekil 17'de gösterildiği üzere; hipoksik grupların MK% değerleri hipoksik olmayanlara göre anlamlı ölçüde yüksektir ($p<0.0001$). Hipoksik gruplar arasında ise; BVC uygulaması ile MK% değerlerinin anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir ($p=0.004$).



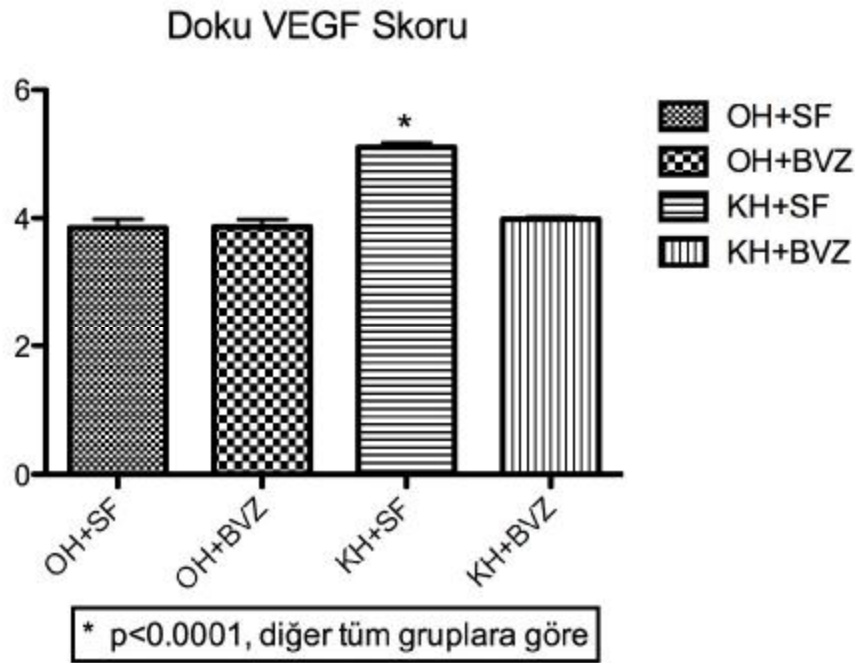
Şekil 17: Medial kalınlık % (MK%) değerlerinin gruplara göre dağılımı

Akciğer doku VEGF immunohistokimya skorları açısından yapılan değerlendirmede; doku VEGF skorları sırasıyla; oda havası + SF grubu için 3.85 ± 0.13 ; oda havası + bevacizumab grubu için 3.86 ± 0.11 ; hipoksi + SF grubu için 5.10 ± 0.06 ; hipoksi + bevacizumab grubu için 3.98 ± 0.04 olarak saptanmıştır.



Şekil 18: Küçük pulmoner arterlerin VEGF antikör boyanmaları (1/200 dilüsyon ile x40 büyütmede) (A: Normal yapıda bir pulmoner arterin kısmı ve hafif yoğunlukta boyanması; B: ılımlı derecede muskuler hipertrofisi olan bir pulmoner arterin orta yoğunlukta ve %90 boyanması; C: muskuler hipertrofisi olan bir pulmoner arterin kuvvetli yoğunlukta ve %100 boyanması; D: İleri derecede muskuler hipertrofisi olan bir pulmoner arterin kuvvetli yoğunlukta ve %100 boyanması)

Oda havası + SF grubunun doku VEGF skoru ile hipoksi + SF grubunun doku VEGF skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0.0001$). Hipoksi + SF grubuyla, hipoksi + bevacizumab grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p < 0.0001$). Bunun yanında; oda havası + SF grubuyla hipoksi + bevacizumab grubu arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.19$).



Şekil 19: Doku VEGF skorlarının gruplara göre dağılımı

Gruplar Arası Karşılaştırmalı Analizler:

Hipoksi uygulamasının sıçanların; 5. ve 8. gün tartılarını azalttığı ($p<0.0001$), sağ ventrikül ortalama basınçlarını ve Fulton indekslerini arttırdığı ($p<0.0001$), MT ve MT% ölçümlerini arttırdığı ($p<0.0001$) ve VEGF doku skorlarını da istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı ($p=0.002$) görülmüştür. Bunun yanında; serum VEGF düzeyi ile hipoksi uygulaması arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p=0.02$).

Yapılan iki yönlü ANOVA analizinde, kronik hipoksi uygulaması ile artan sağ ventrikül basıncı ve Fulton indeksi değerlerinin bevacizumab uygulaması ile azaldığı görülmüş ve bu etki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Sağ ventrikül basıncı için $p=0.002$; Fulton indeksi için $p<0.0001$).

MT, MT% ve doku VEGF Skoru açısından gruplar arasında yapılan ANOVA analizi sonucunda, kronik hipoksi almış olan hayvanlarda bevacizumab uygulamasının sözkonusu değerleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı ortaya konmuştur (sırasıyla $p=0.007$, $p=0.003$ ve $p<0.0001$). Ancak, tartışma bölümünde de detaylandırılacağı gibi, söz konusu azalma hipoksi uygulanmayan grupların düzeyine gerilememektedir.

TARTIŞMA:

Çalışmada elde edilmiş olan sonuçların uygun olarak yorumlanabilmesi için öncelikle, deney düzeneği ve çalışmada kullanılan çeşitli tekniklerin literatürdeki diğer benzer deney düzenekleriyle karşılaştırmasının yapılması uygun olacaktır.

Kronik hipoksi ve türevi uygulamaların PAH modellemesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olduğu çeşitli otörler tarafından belirtilmektedir (21, 31). Kronik hipoksinin VEGF üretimini tetikleyen temel mekanizma olması sebebiyle özellikle PAH-VEGF ilişkisini ortaya koymaya yönelik çalışmalarda kronik hipoksi yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (4, 6, 10, 15, 35, 37, 39, 41, 42, 44).

Oldukça sık kullanılan bir yöntem olmasına rağmen literatürde çeşitli kronik hipoksi uygulamaları mevcuttur. Laboratuvar koşulları göz önüne alınarak bu çalışmada normobarik hipoksi modeli tercih edilmiştir.

Kronik hipoksi modellerinin uygulama süreleri açısından da farklılıklar mevcuttur. Literatürde 1 hafta ila 6 hafta arasında kronik hipoksi maruziyet süreleri bulunmaktadır (41, 42, 44, 47, 48, 49, 56, 57). Taraseviciene ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada kronik hipoksiye ikincil PAH hayvan modelinde PAH'ın birinci haftadan itibaren oluşmaya başladığı ve birinci ve ikinci haftalardaki basınç değerlerinin benzer olduğu gösterilmiştir (44). Kronik hipoksi modelinde sağ kalp basınçlarının üçüncü haftada en yüksek değerine ulaştığı da yine bu çalışmada gösterilmiştir (44). Christou ve ark.'larının yaptığı başka bir çalışmada ise; 3-48 saatlik bir hipoksi maruziyeti sonrasında doku VEGF mRNA düzeylerinin hipoksik ve normoksik gruplarda benzer olmasına karşın; 1-3 haftalık hipoksi maruziyeti sonrası doku VEGF mRNA düzeylerinde anlamlı farklılık geliştiği gösterilmiştir (42). Adnot ve ark.'larının yaptığı bir diğer çalışmada da yine PAH modelinin gelişebilmesi için 1-3 haftalık kronik hipoksi maruziyet sürelerinin yeterli olduğu belirtilmiştir (48).

Literatürde deney düzeneğiyle ilgili başka bazı farklılıklar da mevcuttur. Örneğin çalışmalarda kullanılan fanusların boyutları da çalışmadan çalışmaya belirgin farklılıklar göstermektedir (42, 49, 57). Çalışmamızda ise 215 lt hacmindeki özel yapım fanus kullanılmıştır.

Fanus içi ısı, nem ve metabolit dengesinin sağlanması amacıyla da çok çeşitli uygulamalar mevcuttur. Karbondioksit retansiyonunun önlenmesi amacıyla fanus

içine soda lime yerleştirilmesi (42, 49); fazla nemin uzaklaştırılması amacıyla ventilasyon havasının soğutulması (49) veya fanus içine drierite granülleri (42) veya kalsiyum klorür konulması (57); ile amonyak retansiyonunun önlenmesi amacıyla borik asit kullanılması (42) bu yöntemlerden bazılarıdır. Çalışmamızda karbondioksit retansiyonunu önlemek için soda lime granülleri kullanılmıştır. Böylece, iç ortam gaz ölçümlerinde karbondioksit oranı <0.02 düzeyinde tutulabilmiştir.

Yapılan literatür taramasında görüldüğü üzere; deneysel hayvan çalışmalarında kullanılan bevacizumab ve onun mürin analogu olan A.4.6.1'in uygulama yolları ve dozlarıyla ilgili de farklılıklar mevcuttur. Genel olarak rodentlerde bu ilacın iv veya ip yolla uygulanması tercih edilmektedir (34, 58, 59, 60, 43). Doz açısından çeşitlilik daha da fazladır. Planlanan çalışmanın niteliğine göre (kanser araştırması, diabetik retinopati, diğer...) 0.25 mg/kg ile 10 mg/kg arasında dozların kullanıldığı görülmüştür (59, 60).

Bu konuda yapılmış olan deneysel çalışmalarla ilgili bir diğer tartışmalı nokta pulmoner arterlerin morfometrik değerlendirmesi konusudur. Rodentlerde oluşturulan kronik hipoksiye ikincil PAH modelinde neointimal formasyon ve pleksiform lezyon gibi insan PAH'ına özgü patogonomik lezyonların görülmemesi sebebiyle değerlendirme konusunda sıkıntı mevcuttur (56, 61). Kronik hipoksi rodent modellerinde gelişen PAH'da temel pulmoner vasküler değişiklik medial muskuler kalınlaşmadır ve bu durum olasılıkla yeniden normoksik ortamda kalmakla geri dönüşümlüdür (44, 45, 56). Bu nedenlerden dolayı; çalışmamızda hem modelin oluşup oluşmadığının gösterilmesi hem de bevacizumab uygulamasının pulmoner arterlere olan olası etkilerinin değerlendirilmesi bakımından medial kalınlık ve madial kalınlık % değerlerine bakılması tercih edilmiştir.

Çalışmamızda hipoksi uygulamasıyla hayvanlarda belirgin kilo kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Hipoksi uygulanan grubun başlangıç tartıları 239.33 ± 5.08 gr iken 8. gün sonunda bu değer 183.17 ± 5.09 gr'a gerilemiştir. Hipoksi uygulanmayan grupta ise 8 gün içinde tartı değerlerinde artış gözlenmemiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan bu farkın; PAH gelişmesine ikincil solunum sıkıntısı ve genel durum bozukluğuna bağlı oral alımda azalma, dehidratasyon ve bazal metabolizmadaki artıştan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Literatürdeki benzer çalışmalarda da hipoksik gruplarda kontrol gruplarına göre kilo kaybı olduğu bildirilmiştir (41, 49,

56, 62). Xu ve ark.'larının yaptığı in vitro bir çalışmada, idiopatik PAH'lu hastalardan ve kontrol grubu olarak da normal bireylerden pulmoner arter endotel hücreleri alınmış ve bu hücrelerin glikoz metabolizmaları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, PAH'lu hastaların endotel hücrelerinin enerji gereksinimlerinin kontrol grubununkilere göre 3 kat arttığı gösterilmiştir (62). Bu sonuçların hayvan endotel hücrelerinde de benzerlik gösterebileceği varsayıldığında; PAH gelişmiş olan hayvanların buna ikincil kilo vermelerinin bir nedeninin de bu olduğu yorumu yapılabilir.

Deney sırasında yapılan hemodinamik ölçümlerde; hipoksik grupların sağ ventrikül ortalama basınçları hipoksik olmayan gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (34.67 ± 1.05 mmHg / 10.92 ± 0.29 mmHg; $p < 0.0001$). Literatürdeki diğer PAH ölçümleriyle karşılaştırıldığında bu veriler; kronik hipoksiye ikincil PAH modelinin çalışmamızda başarılı bir şekilde oluşturulduğu lehine değerlendirilebilir. Örneğin Taraseviciene SL ve ark.'larının yapmış oldukları bir çalışmada SU 5416 ile birlikte kronik hipoksi uygulanmış olan sıçanlarda kontrol grubunda 18.3 ± 0.3 mmHg olan pulmoner arter basınçlarının (PAB) 32.3 ± 2.1 mmHg'ya yükseldiği gösterilmiştir (44). Benzer şekilde; Partovian C ve ark.'larının yapmış oldukları başka bir çalışmada kronik hipoksi uygulanmış olan sıçanlarda PAB'lerinin kontrol grubunda ortalama 17 mmHg iken deney gruplarında 30 mmHg'ya yükseldiği gösterilmiştir (41). Partovian C ve ark.'larının başka bir çalışmasında ise kronik hipoksik sıçanların PAB'leri ortalama 28 mmHg civarında iken kontrol gruplarının PAB'lerinin 18 mmHg düzeyinde olduğu gösterilmiştir (45). Klein M ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada ise MCT modeli oluşturulmuş olan hayvanlarda sağ ventrikül sistolik basıncı 82.9 ± 6.0 mmHg iken kontrol gruplarında 27.0 ± 0.5 mmHg; ayrıca sağ ventrikül diyastol-sonu basınçları da deney grubu için 7.7 ± 1.3 mmHg ve kontrol grubu için 2.0 ± 0.2 mmHg olarak ölçülmüştür (28). Bu çalışmalara ek olarak, literatürde kronik hipoksi PAH modellerinde hipoksi uygulanan grupların sağ kalp basınç değerlerinin normoksik gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek saptandığını gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (11, 47, 49, 52).

Çalışmamızdan elde edilen önemli bir hemodinamik veri de bevacizumab uygulaması ve bunun sağ ventrikül basınçlarına etkisine ilişkindir. Hipoksi uygulanan hayvanlardan bevacizumab uygulanmayan grubun sağ ventrikül ortalama

basınçları 37.33 ± 0.95 mmHg iken, bevacizumab uygulananlarda bu değer 32.00 ± 1.03 mmHg düzeyindedir. Bu sonuçlara bakıldığında bevacizumab uygulamasının hipoksik grupta sağ ventrikül ortalama basınçlarını anlamlı olarak düşürdüğü ($p=0.002$) görülmektedir. Hipoksik olmayan hayvanlarda ise bevacizumab uygulamasıyla sağ ventrikül ortalama basınçları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p=0.4$). Literatürde bevacizumab ile ilgili benzer bir etkinlik çalışması bulunmamakla birlikte Klein m ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada MCT modeli oluşturulmuş sıçanlarda imatinib ve sorafenib (VEGF multikinaz inhibitörü) uygulamaları yapılmıştır. Bu çalışmada; hem imatinib hem de sorafenib uygulamalarıyla sağ ventrikül sistolik basıncı, sağ ventrikül diastol-sonu basıncı ve Fulton indeksi (ilerleyen bölümlerde kendi sonuçlarımız da ayrıntılı olarak irdelenecektir) gib önemli parametrelerin her birinde iyileşme olduğu gösterilmiştir (28). Yine aynı çalışmada kinaz inhibitörü uygulamalarının normoksik hayvan gruplarında bu parametrelere herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (28). Kullanılan kinaz inhibitörleri arasında farklılık olsa da bu grup ajanların etkinliklerinin değerlendirilmesi bakımından bu çalışmanın sonuçlarının bizim çalışmamızın sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği düşünülmüştür. Hem bu çalışmada hem de bizim çalışmamızda, normoksik hayvanlarda, kinaz inhibitörü uygulamasıyla sağ ventrikül basınçlarında anlamlı değişiklik olmaması; bunun yanında PAH modeli oluşturulmuş olan hayvanlarda, bu ajanların uygulanmasıyla, sağ ventrikül basınçlarında anlamlı düşüşler sağlanmış olması kinaz inhibitörlerinin akciğer ve kalp dokuları üzerine dual etkilerinin olduğu yönünde yorumlanabilir.

Sorafenib ile yapılmış olan bir diğer önemli deneysel çalışmada; sorafenibin renal hücreli karsinom ve hepatoselüler karsinomdaki etkinliğinin tümör damarlanması üzerine olması bilgisinden hareketle; bu ajanın aynı zamanda, PAH'daki neoplazm benzeri vaskülopati ve anjiogenetik disregülasyon üzerinde de etkili olabileceği düşünülmüştür (6). Bu çalışmada PAB'ları, sağ ventrikül basınçları ve Fulton indeksleri üzerinde sorafenib uygulanmasıyla belirgin iyileşme saptanmıştır (6). Araştırmacılar elde ettikleri bu bilgiden hareketle; sorafenibin hali hazırda kanser hastaları için onay almış, kullanılmakta olan ve iyi tolere edilen bir ilaç olması sebebiyle PAH tanılı hastalarda kullanılmasının da çok daha kolay olacağı yönünde bir yorumda bulunmuşlardır. Benzer şekilde; bizim çalışmamızda kullanmış

olduğumuz bevacizumab da klinik pratikte kanser hastaları için kullanılmakta olan ve iyi tolere edilen bir ilaçtır. Bu bakımdan bevacizumab'ın PAH hastalarındaki Faz 2 çalışmalarda kullanılmasında da çok daha kolay olacaktır.

Çalışmamızda sol ventrikül basınçlarının hipoksi uygulamasıyla anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir ($p > 0.0001$). Ayrıca, hipoksik grupta, bevacizumab uygulamasıyla da sol ventrikül basınçlarında anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir ($p = 0.03$). Ancak normoksik grupta bevacizumab uygulamasının sol ventrikül basınçlarını etkilemediği de görülmüştür ($p = 0.43$). Literatürde hipoksi uygulamasıyla sol ventrikül basınçlarında azalma olduğunu gösteren yayınlar olmakla birlikte (41); sol ventrikül basınçlarının etkilenmediğini gösteren yayınlar da mevcuttur (28, 45). Sol ventrikül basınçlarındaki bu değişkenlik PAH patogenezinde rolü olan çeşitli mediatörlerin karmaşık etkileşiminden kaynaklanıyor olabilir.

Diğer bir önemli parametre olan Fulton indeksi de sağ ventrikül hipertrofinin değerlendirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Yapmış olduğumuz deneyde hipoksik hayvanların Fulton indekslerinde normoksik hayvanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözlemledik ($0.28 \pm 0.01 / 0.22 \pm 0.01$; $p < 0.0001$). Kronik hipoksi uygulamasıyla Fulton indekslerinde artış olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (6, 41, 44, 45, 49, 56). Literatürde hipoksiye maruz kalmış hayvanların Fulton indeksleri; modelin şiddetine göre, 0.26 ile 0.37 arasında değişmektedir (6, 41, 44). Çalışmamızda ayrıca; hipoksik hayvanların Fulton indekslerinde bevacizumab uygulamasıyla istatistiksel olarak anlamlı düşüşler elde edildiği gösterilmiştir ($p < 0.0001$). Hipoksi uygulanmayan grupta ise bevacizumab uygulamasına bağlı anlamlı Fulton indeks değişikliği saptanmamıştır ($p = 0.27$). Tüm bu bilgilerden hareketle; bevacizumabın ancak sağ kalp hipertrofinin geliştiği durumlarda hipertrofiyi azaltma yönünde bir etki gösterebileceği yorumu yapılabilir. Ancak, bu etkinin bevacizumabın pulmoner arter basınçlarını azaltıcı etkisinden mi, yoksa doğrudan kalp üzerine olan olası diğer etkilerinden mi kaynaklandığı henüz bilinmemektedir.

Araştırmamızda, tüm bu intrakardiyak basınç ve sağ kalp hipertrofi ölçümlerinin yanında; VEGF serum ve doku düzeyleri ile pulmoner arter morfolojisine yönelik incelemeler de yapılmıştır.

ELISA yöntemiyle yapılmış olan serum VEGF ölçümlerinde hipoksik hayvanların serum VEGF düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.05$). Ancak bevacizumab uygulamasının ne kontrol ne de hipoksi gruplarında serum VEGF düzeyleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir ($p=0.42$). Literatürde de benzer şekilde; hem PAH tanısı olan insanlarda (37); hem de deneysel PAH modeli oluşturulmuş olan hayvanlarda (41, 42) serum VEGF düzeylerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Serum VEGF düzeylerinin bevacizumab uygulamasından etkilenmemesi ilginç bulunmuştur. Bunun nedeninin ne olabileceği konusunda elimizde herhangi bir literatür verisi bulunmamaktadır. Ancak, bu durumun serum VEGF ölçümlerindeki kısıtlılıklardan da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Pulmoner arterlerin morfometrik değerlendirmeleri de oldukça ilginç bilgiler sağlamıştır. Yapılan medial kalınlık ve medial kalınlık % ölçümleriyle net olarak ortaya konulmuştur ki; küçük pulmoner arterlerin hem medial kalınlık miktarları hem de bu medial kalınlıklarının eksternal damar çapına oranları, hipoksi uygulaması ile anlamlı olarak artmaktadır [(MK için; $15.33 \pm 0.33 \mu\text{m} / 27.30 \pm 0.41 \mu\text{m}$; $p<0.0001$) ve (MK% için; $16.76 \pm 0.26 / 29.00 \pm 0.33$; $p<0.0001$)].

Buna ek olarak hipoksik gruplarda bevacizumab uygulamasıyla hem MK hem de MK% değerlerinin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır [(MK için; $27.30 \pm 0.41 \mu\text{m} / 24.97 \pm 0.51 \mu\text{m}$; $p=0.002$) ve (MK% için; $29.00 \pm 0.33 / 27.54 \pm 0.29$; $p=0.004$)]. Ancak, saptanmış olan bu düşüş normal hayvanların MK ve MK% değerleri düzeyinde de değildir. Zira; normoksik grup ile hipoksi ve bevacizumabın birlikte uygulandığı deney grubu arasında da anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.0001$). Bu iki veri grubu bir arada değerlendirildiğinde kronik hipoksiye ikincil PAH geliştirilen hayvanlarda bevacizumab uygulamasının medial kalınlığı ve medial kalınlık / eksternal damar çapı oranını azalttığı ancak her iki parametreyi de normal düzeylere çekemediği yorumu yapılabilir.

Bevacizumab uygulamasının PAH gelişmiş olan akciğer dokusuna olan etkileriyle ilgili literatürde herhangi bir deneysel çalışma bulunmadığından bu konuyla ilgili karşılaştırmalı bir değerlendirme yapılamamaktadır. Ancak sağ ventrikül basınç değerlerinin tartışıldığı bölümde ayrıntılı olan bahsedilen Klein M ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada PAH hayvan modeline bir multikinaz

inhibitörü olan sorafenibin uygulanmasıyla; sağ ventrikül basınçlarındaki azalmaya paralel olarak, akciğer damar vaskülarizasyonunda da azalma görüldüğü bildirilmiştir (28).

Son veri grubu olan doku VEGF skorları değerlendirildiğinde; hipoksi uygulamasının doku VEGF düzeylerini anlamlı oranda arttırdığı ($3.85 \pm 0.13 / 5.10 \pm 0.06$; $p < 0.0001$) saptanmıştır. Bunun yanında; hipoksik gruplarda bevacizumab uygulamasıyla doku VEGF skorlarında anlamlı oranda azalma olduğu ($5.10 \pm 0.06 / 3.98 \pm 0.04$; $p < 0.0001$) ve bu azalmanın kontrol grubunun değerlerine benzer olduğu ($p = 0.19$) görülmüştür. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde; kronik hipoksi ile oluşturulmuş PAH hayvan modelinde hipoksi uygulamasına ikincil belirgin artmış akciğer doku VEGF değerlerinin, bevacizumab tarafından normal değerlere geriletebildiği yorumu yapılabilir.

Literatürdeki benzer çalışmalarda da hayvanlarda kronik hipoksi uygulamasıyla; hem immunohistokimyasal hem de genetik incelemelerle, akciğer doku VEGF düzeyi ve VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (42, 45, 52, 63, 64). PAH tanısı olan insanların akciğer dokularında da benzer şekilde VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (19). Diğer bazı deneysel hayvan çalışmalarında ise; kronik hipoksi maruziyeti ile akciğer doku VEGF düzeylerinde anlamlı bir ilişki olmadığı gösterilmiştir (65).

VEGF, akciğer yapısının oluşumunda temel mediatörlerden biridir. Kronik VEGF inhibisyonunda (SU-5416 ile) veya genetik olarak akciğer-spesifik VEGF knockdown farelerde amfizem geliştiği gösterilmiştir (28, 44).

Ayrıca, Partovian C ve ark.'larının yaptığı bir deneysel çalışma ile; adenovirus aracılı gen transferiyle meydana getirilen VEGF overekspresyonunun kronik hipoksiye maruz bırakılan sıçanlarda PAH'u ve sağ ventrikül hipertrofisini arttırdığı gösterilmiştir (41).

Araştırmacılar, bu çalışma sonuçlarına dayanarak, PAH'da VEGF tedavisinin yararı olabileceğini düşünmüşlerdir. Taraseviciene SL ve ark.'larının yapmış oldukları bir çalışmada kronik hipoksiyle beraber VEGF blokajı yapılması suretiyle ağır PAH oluşturulmuş olan sıçanlara VEGF tedavisi uygulamışlardır (66). Ancak; ilginç bir şekilde, bu uygulamanın sonucunda PAH basınçlarında azalma yerine

kötüleşme görülmüştür (66). VEGF tedavisi uygulanmış olan 3 sıçandan 2'si tedavinin ilk 3 haftası içinde ölmüşlerdir (66).

Çalışmamız sonucu elde edilen tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde sonuçların iki temel konuda gruplanabileceği görülmektedir. Bunlardan ilki hipoksi uygulamasıyla; sağ kalp ortalama basınçları, Fulton indeksleri, serum VEGF düzeyleri, doku VEGF skorları, medial kalınlık ve medial kalınlık % skorlarında elde edilen anlamlı değişikliklerdir. Bu verilerin, literatürdeki benzer çalışmaların verileriyle ayrıntılı olarak karşılaştırılması sonucu; çalışmamız sırasında planlanmış olan kronik hipoksiye ikincil PAH modelinin başarıyla oluşturulduğu anlaşılmış olur.

Elde edilen verilerden çıkarılabilecek ikinci önemli sonuç ise bevacizumabın deneysel PAH modeli üzerine olan etkileriyle ilgilidir. Başarıyla oluşturulmuş olan kronik hipoksiye ikincil PAH hayvan modelinde bevacizumab uygulamasıyla sağ ventrikül ortalama basınçları, Fulton indeksleri, medial kalınlık ve medial kalınlık % skorları ile doku VEGF skorlarında anlamlı düşüşler saptanmıştır. Ancak; yukarıda ayrıntılı olarak ele alındığı üzere, pek çok parametre için bu düşüş miktarı normal değerlerle benzer düzeyde olamamıştır. Sonuç olarak bevacizumab'ın PAH'a bağlı pek çok parametrede iyileşme sağladığı ancak bunun PAH'la ilişkili tüm verileri normalleştirecek düzeyde olmadığı söylenebilir. Diğer multikinaz inhibitörleri olan imatinib ve sorafenibe benzer şekilde PAH parametrelerinde anlamlı iyileşmeler sağladığı çalışmamızla gösterilmiş olan diğer bir tirozin kinaz inhibitörü olan bevacizumab için de ek bazı çalışmalardan sonra PAH tedavisi açısından Faz 2 çalışmalarının planlanabileceğini düşünüyoruz.

Tüm bu yararlı sonuçlara rağmen çalışmaya ilişkin önemli sınırlılıklar da bulunmaktadır. Bunların başında deney düzeneği ile ilgili sınırlılıklar gelmektedir. Teknik yetersizlikler sebebiyle, fanus içi havadaki metabolitler ve nem yeterince dengede tutulamadığından gelişen toksisiteye bağlı hayvanların hızla kilo kaybettikleri görülmüştür. Teknik olarak daha yeterli bir deney düzeneği kurulabilmiş olsaydı belki de hayvanlar daha uzun süre hipoksiye maruz kalabileceklerdi ve daha ağır bir PAH modeli oluşturulmuş olacaktı.

Diğer bir önemli kısıtlılık ise uygulanmış olan cerrahi prosedürdür. Deneysel hayvan laboratuvarımızda skopi cihazının bulunmaması sebebiyle pulmoner arter kateterizasyonu yapılamamıştır. Dolayısıyla doğrudan pulmoner arter basınç

ölçümleri yerine, bu konuda dolaylı yoldan bilgi veren intrakardiyak ölçümler kullanılmak zorunda kalmıştır.

Bevacizumabın murin formu olan A.4.6.1 formu yetkili firmayla yapılan görüşmeler sonucu temin edilemediğinden (bu ajanın ticari formu bulunmamaktadır, yalnızca üretici firma izniyle kendilerinden temin edilebilmektedir) daha az spesifik olan humanize form kullanılmak zorunda kalmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda ajanın murin formu temin edilerek yapılacak çalışmalarda çok daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceği kanaatindeyiz.

Bunun dışında elbette ki, serum VEGF ELISA ve doku VEGF immunohistokimyasıyla ilgili de teknik sorunlar olabilmektedir. Bu antijen-antikor bazlı işlemlerde çeşitli mediatörler arasındaki interaksiyonlar sonuçları etkileyebilmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamız bilindiği kadarıyla Türkiye’de Göğüs Hastalıkları alanında yapılmış olan ilk kronik hipoksiye ikincil PAH modelidir. Modelin başarıyla oluşturulmuş olmasıyla; model bundan sonra, bu alanda yapılacak olan diğer pek çok çalışmada kullanılabilir. Bunun yanında, kronik hipoksiye ikincil PAH modelinde uygulanmış olan bevacizumab ile literatüre yeni ve anlamlı bilimsel katkılarda bulunmuş olduğumuzu düşünmekteyiz. Son yıllarda imatinib ve sorafenib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin PAH üzerindeki olumlu etkileriyle paralel şekilde bevacizumab ile de PAH parametrelerinin pek çoğunda iyileşme saptamış olmamızın bu alandaki başka Faz 1 ve hatta Faz 2 çalışmalara ufuk açacağını umuyoruz. Elbette ki, çalışmamızın sistematik bir Faz 1 çalışma olmaması ve bu alanda yapılan (bevacizumabın PAH’a etkisi) literatürdeki ilk çalışma olması sebebiyle daha çok Faz 1 çalışmaya ihtiyaç vardır. Faz 1 çalışmaların çoğunda benzer sonuçlar elde edilmesi halinde Faz 2 çalışmalara da geçilebilmesi halinde belki de PAH tedavisi için yeni bir ilaç daha bulunmuş olacaktır. Bu ilaç hem tek başına hem de kombinasyon tedavilerinde kullanılabilir ve belki de hastaların klinik parametrelerine ve sağkalımlarına katkıda bulunabilecektir. Bu tip çalışmaların çoğalması halinde akciğer anjiogenezinin temel mediatörü olan VEGF’nin PAH patogenezindeki yerinin aydınlatılabilmesi açısından da çok önemlidir. Tüm bu soruların yanıtları, yapılacak olan yeni ve daha kapsamlı çalışmaların sonuçlarında gizlidir.

ÖZET:**KRONİK HIPOKSİ İLE OLUŞTURULMUŞ PULMONER ARTERİYEL
HİPERTANSİYON HAYVAN MODELİNE BEVACİZUMAB
UYGULAMASININ ETKİLERİ**

Amaç: Kronik hipoksiye ikincil pulmoner hipertansiyon rat modelinde, bevacizumab(VEGF antikoru) uygulamasının sağ kalp basınçları ve VEGF serum, kalp ve akciğer doku düzeylerine etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 200-250mg aralığındaki Wistar-albino ratlar kullanılmıştır. Grup1(n=6): oda havası+serum fizyolojik(SF); Grup2(n=6): oda havası+bevacizumab; Grup3(n=6): hipoksi+SF; Grup4(n=6): hipoksi+bevacizumab uygulamaları yapılmıştır. Hipoksi gruplarına %10 oksijen+%90 azot gaz karışımı verilmiştir. 5.günde SF veya bevacizumab uygulamaları yapılmış ve 8.günde genel anestezi altında anterior torakotomi sonrası doğrudan sağ kalp ve sol kalp basınçları ölçülmüş, sonrasında tam vücut kanları ve akciğer dokuları alınmıştır. Postmortem sağ ventrikül/(sol ventrikül + septum) ağırlıkları (Fulton İndex) ölçülmüştür.

Bulgular: Sağ kalp basınç ortalamaları Grup1'de 10.83 ± 0.48 mmHg, Grup2'de 11.00 ± 0.037 mmHg, Grup3'de 37.33 ± 0.95 mmHg, Grup4'te 32.00 ± 1.03 mmHg'dır. Grup 3 ve Grup 4 sağ kalp basınçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır($p=0.002$). Benzer şekilde Grup3 (0.31 ± 0.01) ve Grup4 (0.25 ± 0.01)'ün Fulton indexleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır($p<0.0001$). Serum VEGF düzeyleri açısından hipoksik grup ile hipoksik olmayan grup arasında anlamlı farklılık saptanmakla birlikte ($p=0.05$); BVC uygulamasıyla anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır ($p=0.42$). Gruplar için MK değerleri de sırasıyla; $15.33 \pm 0.33 \mu\text{m}$; $15.49 \pm 0.37 \mu\text{m}$; $27.30 \pm 0.41 \mu\text{m}$; $24.97 \pm 0.51 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır. MK değerleri açısından; hipoksik olan grupların hipoksik olmayan gruplara göre anlamlı ölçüde yüksek değerlere sahip oldukları ($p<0.0001$) ve BVC uygulaması ile de bu değerlerde anlamlı düşüş meydana geldiği ($p<0.0001$) gösterilmiştir. İlginç olarak; hipoksi + SF grubunun doku VEGF skoru diğer tüm gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmış ($p<0.0001$); ancak, hipoksi + BVC grubunun doku VEGF skorları ile hipoksik olmayan grupların skorları arasında anlamlı farklılık saptanamamıştır ($p>0.05$).

Sonuç: Hipoksi uygulanmayan ve uygulanan gruplar arasında sağ kalp basınçları, Fulton indeksleri, serum VEGF düzeyleri, MK ve MK% değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı çıkması modelin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir. Hipoksik gruplar arasında bevacizumab uygulaması ile sağ kalp basınçlarında, fulton indekslerinde, MK ve MK% değerlerinde ve doku VEGF skorlarında anlamlı düşüş saptanması ise bevacizumabın akut etkisinin pulmoner arter basınçlarını düşürme lehine olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmayla, antineoplastik ajan olarak kullanılan bevacizumab'ın pulmoner hipertansiyon mekanizması üzerine de etkileri olabileceği gösterilmiştir.

SUMMARY:**EFFECTS OF BEVACIZUMAB ADMINISTRATION ON THE CHRONIC HYPOXIC PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION ANIMAL MODEL**

Aim: To establish the interaction of right ventricle pressures; serum, lung and heart tissue VEGF levels and bevacizumab administration in pulmonary arterial hypertension rat model secondary to chronic hypoxia exposure.

Method: Wistar-albino rats between 200-250 mg were used. Group1(n=6): room air+serum physiologic (SF); Group2(n=6): room air+bevacizumab; Group3(n=6): hypoxia+SF; Group4(n=6): hypoxia+bevacizumab. 10% oxygen and 90% nitrogen gas mixture was administered to hypoxia groups. SF and bevacizumab administered in day 5 and under general anesthesia, anterior thoracotomy was applied in day 8. Right and left ventricle pressures were measured directly from heart. After that, whole body blood and lung tissues were taken. Postmortem right ventricle/(left ventricle + septum) weight ratios (Fulton index) were measured.

Results: Right ventricle pressure means were 10.83 ± 0.48 mmHg in Group1; 11.00 ± 0.37 mmHg in Group2; 37.33 ± 0.95 mmHg in Group3 and 32.00 ± 1.03 mmHg in Group4. Difference of right ventricle pressures between Group3 and 4 was statistically significant ($p=0.002$). Difference of Fulton index of Group3 (0.31 ± 0.01) and 4 (0.25 ± 0.01) were statistically significant ($p<0.0001$). Serum VEGF levels were also significantly different ($p=0.05$) between hypoxic and nonhypoxic groups; but, there was no significant difference with BVC administration ($p=0.42$). MK values for groups were; 15.33 ± 0.33 μm ; 15.49 ± 0.37 μm ; 27.30 ± 0.41 μm ; 24.97 ± 0.51 μm . Difference of MK values between hypoxic and nonhypoxic groups was significant ($p<0.0001$) and also; there was a significant decrease in these values with BVC administration ($p<0.0001$). Interestingly, VEGF tissue score of hypoxia + SF group was significantly higher than the other groups ($p<0.0001$); but, there wasn't a statistically significant difference between the VEGF tissue scores of hypoxia + BVC group and nonhypoxic groups ($p>0.05$).

Conclusion: Statistically significant differences in right ventricle pressures, Fulton index, serum VEGF levels, MK and MK% values between nonhypoxic and hypoxic groups represent us that, model has been established successfully. The statistically significant decrease in right ventricle pressures, Fulton index, MK and MK% values and VEGF tissue scores with bevacizumab administration in hypoxic groups is interpreted as bevacizumab's acute effect is in favour of decreasing the pulmonary arterial hypertension. In our study, we established that bevacizumab which is an antineoplastic agent indeed, can have some effects on pulmonary arterial hypertension mechanisms.

KAYNAKLAR:

1. Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. Fourth edition, 2005; Volume 2:1465-1474.
2. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2008 Jul; 118(7):2372-9.
3. Archer SL, Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2009 Nov 5;361(19):1864-71.
4. Palmar MJ. Leads of the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2009 May;19(5):575-92.
5. Bogaard HJ et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009 Nov 17;120(20):1951-60.
6. Moreno-Vinasco L et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol. Genomics.* 2008 Apr 22;33(2):278-91.
7. Humbert M et al. Pulmonary arterial hypertension in France. *Am J respir Crit Care Med.* 2006 May 1;173(9):1023-30.
8. Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jan;44(1):14-30.
9. Oka M et al. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res.* 2007 Mar 30;100(6):923-9.
10. Said SI. Mediators and modulators of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Oct;291(4):L547-58.
11. Taraseviciene-Stewart L et al. Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Jun 15;175(12):1280-9.
12. Durrington HJ, Morrell NW. What we know and what we would like to know about genetics and pulmonary arterial hypertension. *Int J Clin Pract Suppl.* 2009 Mar;(161):11-6.
13. Yildiz P. Molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Chim Acta.* 2009 May;403(1-2):9-16.

14. Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5:663-71.
15. Austin ED, Loyd JE. Genetics and mediators in pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med.* 2007 Mar;28(1):43-57.
16. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* [Epub ahead of print]
17. Nishimura T et al. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation.* 2003 Sep 30; 108(13):1640-5.
18. Nishimura T et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Nov 15;166(10):1403-8.
19. Tuder RM, Groves B, Badesh DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1994 Feb;144(2):275-85.
20. Sztrymf B, Yaici A, Girerd B, Humbert M. Genes and pulmonary arterial hypertension. *Respiration.* 2007;74(2):123-32.
21. Umar S et al. Novel approaches to treat experimental pulmonary arterial hypertension: A review. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:702836.
22. Davies RJ, Morrell NW. Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: Role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest.* 2008 Dec;134(6):1271-7.
23. Campbell AI, Zhao Y, Sandhu R, Stewart DJ. Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation.* 2001 Oct 30;104(18):2242-8.
24. Bautet K et al. Therapeutic advances in respiratory disease. *Ther Adv Respir Dis.* 2008 Aug;2(4):249-65.
25. Rhodes CJ, Davidson A, Gibbs JS, Wharton J, Wilkins MR. Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther.* 2009 Jan;121(1):69-88.

26. Olsson KM, Hoeper MM. Novel approaches to the pharmacotherapy of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discov Today*. 2009 Mar;14(5-6):284-90.
27. Wojciak-Stothard B. New drug targets for pulmonary hypertension: Rho GTPases in pulmonary vascular remodelling. *Postgrad Med J*. 2008 Jul;84(993):348-53.
28. Klein M et al. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation*. 2008 Nov 11;118(20):2081-90.
29. Farkas L et al. VEGF ameliorates pulmonary hypertension through inhibition of endothelial apoptosis in experimental lung fibrosis in rats. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1298-311.
30. Bauer NR, Moore TM, McMurty IF. Rodent models of PAH: are we there yet? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L580-2.
31. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurty IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Dec;297(6):L1013-32.
32. White RJ et al. Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007 Sep;293(3):L583-90.
33. Zielinski J. Effects of intermittent hypoxia on pulmonary haemodynamics: animal versus studies in humans. *Eur Respir J*. 2005 Jan;25(1):173-80.
34. Bogaard HJ et al. Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo. *Circulation*. 2009 Nov 17;120(20):1951-60.
35. Lahm T et al. The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury. *Shock*. 2007 Jul;28(1):4-14.
36. Voelkel NF, Vandivier RW, Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Feb;290(2):L209-21.
37. Selimovic N et al. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009 Sep;34(3):662-8.

38. Gressett SM, Shah SR. Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. *Ann Pharmacother*. 2009 Mar;43(3):490-501.
39. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulianis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe?. *Respir Res*. 2006 Oct 17;7:128.
40. Lu D et al. Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res*. 2001 Oct 1;61(19):7002-8.
41. Partovian C et al. Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000 Dec;23(6):762-71.
42. Christou H et al. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Jun;18(6):768-76.
43. Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):671-80.
44. Taraseviciene-Stewart L et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001 Feb;15(2):427-38.
45. Partovian C et al. Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6Pt2):H1948-56.
46. Cohen MT, Gootenberg J, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: Bevacizumab (Avastin®) plus carboplatin and paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2007 Jun;12(6):713-8.
47. Laudi S et al. Comparison of lung proteome profiles in two rodent models of pulmonary arterial hypertension. *Proteomics*. 2007 Jul;7(14):2469-78.

48. Adnot S et al. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87:155-62.
49. Yuyama H et al. A novel and selective endothelin ET_A receptor antagonist YM598 prevents the development of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Vascul Pharmacol.* 2005 Jun;43(1):40-6.
50. Ivy DD et al. Development of occlusive neointimal lesions in distal pulmonary arteries of endothelin B receptor-deficient rats: A new model of severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005 Jun 7;111(22):2988-96.
51. Jones JE et al. Serial noninvasive assessment of progressive pulmonary hypertension in a rat model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jul;283(1):H364-71.
52. Azoulay E et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances alpha-naphthylthiourea-induced pulmonary hypertension. *J Appl Physiol.* 2003 May;94(5):2027-33.
53. Rondelet B et al. Signaling molecules in oversirculation-induced pulmonary hypertension in piglets: Effects of sildenafil therapy. *Circulation.* 2004 Oct 12;110(15):2220-5.
54. Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *J Appl Physiol.* 2006 Feb;100(2):672-8.
55. Reiner A et al. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. *Cancer Res.* 1990 Nov 1;50(21):7057-61.
56. Meyrick B, Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol.* 1980 Jul;100(1):151-78.
57. Nakamoto t et al. Effects of olmesartan medoxomil as an angiotensin II-receptor blocker in chronic hypoxic rats. *Eur J Pharmacol.* 2005 Dec 28;528(1-3):43-51.

58. Hotz HG et al. Evaluation of vascular endothelial growth factor blockade and matrix metalloproteinase inhibition as a combination therapy for experimental human pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* 2003 Feb;7(2):220-7.
59. Raatschen HJ et al. Vascular permeability during antiangiogenesis treatment: MR imaging assay results as biomarker for subsequent tumor growth in rats. *Radiology.* 2008 May;247(2):391-9.
60. Bauerle T et al. Bevacizumab inhibits breast cancer-induced osteolysis, surrounding soft tissue metastasis, and angiogenesis in rats as visualized by VCT and MRI. *Neoplasia.* 2008 May;10(5):511-20.
61. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol.* 1997 Apr;150(4):1349-60.
62. Xu W et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Jan 23;104(4):1342-7.
63. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. *J Clin Invest.* 1995 Apr;95(4):1798-807.
64. Pfeifer M et al. Vascular remodeling and growth factor gene expression in the rat lung during hypoxia. *Respir Physiol.* 1998 Feb;111(2):201-12.
65. Sandner P, Gess B, Wolf K, Kurtz A. Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo. Divergent regulation of vascular endothelial growth factor and of erythropoietin gene expression in vivo.
66. Taraseviciene-Stewart L et al. Simvastatin causes endothelial cell apoptosis and attenuates severe pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Oct;291 (4):L668-76.