

Bevakizumab ve Pegaptanip sodyum'un civciv koryoallantoik membrandaki in vivo anjiyogenez üzerine etkisi

A.Hakan Durukan (*), Taner Özgürtaş (**), M.Kemal Erbil (**), İbrahim Aydın (**), Tarkan Mumcuoğlu (*), Serkan Tapan (**), Suat Karagül (*)

Özet

Bu çalışmanın amacı, yaşa bağlı maküla dejenerasyonunun tedavisinde sıkça kullanılan iki preparatın (Pegaptanip sodyum ve Bevacizumab) anti-anjiyojenik etkinliğini civciv koryoallantoik membran modelinde göstermektir. Çalışmada, Atak-S cinsi tavuklardan alınan döllenmiş yumurtalar kullanıldı. Yumurtalar uygun nem ve sıcaklık şartları altında uygulamanın yapılacağı 5. güne kadar bekletildi. Daha sonra Pegaptanip sodyum ve Bevacizumab'ın farklı konsantrasyonları yumurtalara uygulandı ve sonuçlar değerlendirilinceye kadar uygun koşullarda saklandı. Sonuçlar, uygulama sonrası 48. saatte değerlendirildi. Her iki ilacın da insanlarda yaşa bağlı maküla dejenerasyonundaki olumlu etkilerine rağmen, civciv koryoallantoik membran modelinde anti-anjiyojenik etkileri gözlenmedi. Bu sonuçların seçilen ilaç dozlarının yetersizliğinden veya insan ve civciv damar endotelinin büyüme faktörü izoformlarının farklı özelliklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüş ve bu nedenle daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Anjiyogenez, anti-anjiyojenik etki, VEGF

Summary

The effects of Bevacizumab and Pegaptanip sodium on in vivo angiogenesis in chick chorioallantoic membrane

The purpose of this study was to demonstrate the anti-angiogenic efficacy of the two agents (Pegaptanip sodium

and Bevacizumab), which are commonly used in the treatment of age-dependent macula degeneration in chick chorioallantoic membran model. Fertilized eggs obtained from Atak-S type chicken were used. The eggs were kept under appropriate heat and humidity until the fifth day on when the application would be performed. Pegaptanip sodium and Bevacizumab were applied to eggs at different concentrations, and the eggs were kept under an appropriate condition until the evaluation of the results. Results were evaluated at the 48th hour after application. Although both of the two agents have affirmative effects on age-dependent macula degeneration in humans, they did not have any anti-angiogenic effects in chick chorioallantoic membran model. These findings may have resulted from inadequate doses of drugs chosen or from different features of human and chick vascular endothelial growth factor isoforms, and thus, more detailed studies are needed to perform.

Key words: Angiogenesis, anti-angiogenic effect, VEGF

Giriş

Anjiyogenez veya yeni damar oluşumu embriyogenez sırasında temel olaylardan birisidir. Embriyogenez dışında, yetişkinlerde anjiyogenez çok sınırlı olaylarda; yaralanma sonrası doku tamiri ve menstrüyel siklus sırasında görülmektedir. Anjiyogenez bazen de tümör gelişimi, psöriyazis ve koroid neovaskülarizasyon gibi bazı patolojik olaylarda önemli bir rol oynamaktadır (1). Bu nedenle, anjiyogenez konusu aktif bir araştırma alanıdır. Kan damarı oluşumu, birçok hücre tipinin ve çok sayıda molekülün katıldığı kompleks çok basamaklı bir süreçtir. İn vitro modeller bu süreçle ilgili önemli bilgiler sunmakla birlikte, in vivo etkinin ne olacağını tam olarak gösteremez. Anjiyogenez araştırmalarında çok yaygın olarak kullanılan ve oldukça faydalı bir in vivo model, civciv koryoallantoik membran (CAM) modelidir.

* GATF Göz Hastalıkları AD

**GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD

Bu çalışma, 41. Ulusal Türk Oftalmoloji Derneği Kongresi'nde (Antalya, 30 Ekim-2 Kasım 2007) poster bildirisi olarak sunulmuştur

Ayrı basım isteği: Dr. Taner Özgürtaş, GATF Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, Etilik-06018, Ankara
E-mail: tozгурtas@gata.edu.tr

Makalenin geliş tarihi: 29.11.2007

Kabul tarihi: 28.02.2008

Anjiyogenez, süreci pozitif ve negatif etkileyen moleküller arasındaki dengeye bağlı kontrol edilir. Pozitif etkili pro-anjiyojenik moleküller, eğer baskın hale gelirse anjiyogenez süreci tetiklenir ve yeni damar oluşumu meydana gelir. Bu konsept, "anjiyojenik anahtar (switch)" olarak adlandırılır (2). Damar endotelinin büyüme faktörü (VEGF) majör pro-anjiyojenik faktördür. VEGF'in asıl fonksiyonu, endotel hücrelerinin yaşam sürelerini uzatması, endotel hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu artırarak anjiyogenezi desteklemektir (3).

VEGF düzeylerinin artışı anjiyogenezi artırıcı yönde etkili olmaktadır. Bu nedenle, VEGF düzeylerinin baskılanması anti-anjiyojenik etki oluşturmaktadır. Bu amaçla üretilen ve "American Food and Drug Administration" (FDA) tarafından onaylanan ilk preparat Bevakizumab'dır (Avastin®). Son zamanlarda bir diğer VEGF preparatı olan Pegaptanip sodyum'un da olumlu etkilerine ilişkin çok sayıda yayın bulunmaktadır (4,5).

Bu çalışmada, farklı etki mekanizmalarına sahip iki anti-VEGF preparatının etkinliğini civciv koryoallantoik membran modelinde karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Bevakizumab solüsyonunun hazırlanışı: 100 mg/4 ml Bevakizumab (Altuzan®, Roche®) preparatından farklı konsantrasyonlarda (40, 60 ve 120 µg) çalışma solüsyonları hazırlandı.

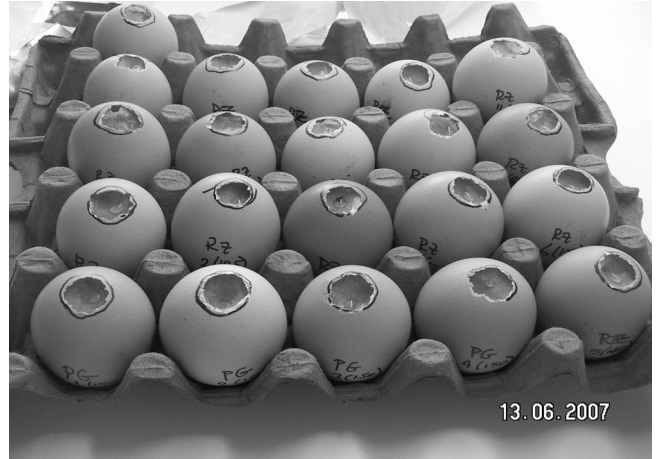
Pegaptanip sodyum solüsyonunun hazırlanışı: 0.3 mg /90 µg Pegaptanip sodyum (Macugen®, Pfizer®) preparatından 75 µg'lık çalışma solüsyonu hazırlandı.

CAM ölçümü: CAM ölçümlerinin tamamı GATF Biyokimya AD Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Atak-S cinsi döllenen yumurtalar, Tavukçuluk Entitütüsünden (Ankara, Türkiye) sağlandı ve deney boyunca 37 °C, %85-90 nemli ortamda inkübe edildi. Bevakizumab ve Pegaptanip sodyum uygulaması için, 5 günlük yumurtalar sırasıyla 14 ve 28'li gruplar halinde ayrıldı ve çalışma solüsyonları uygulandı. Anjiyogeneze ilişkin değişiklikler, uygulamadan 48 saat sonra literatürde belirtildiği şekilde koryoallantoik membran üzerinde değerlendirildi ve digital kamera kullanılarak görüntüler kaydedildi (Konica Minolta, Tokyo, Japan) (6).

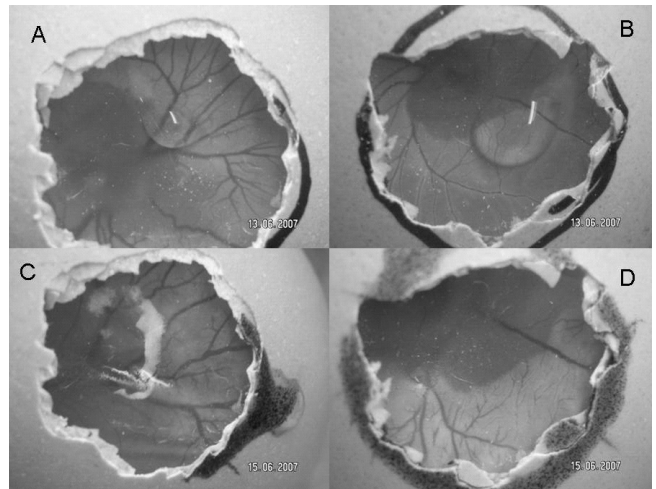
Bulgular

Doza bağlı ilaç etkinliğini göstermek üzere preparatların farklı konsantrasyonları beş günlük CAM'a uygulandı (Şekil 1). CAM'daki anjiyogeneze ilgili değişiklikler 48 saat sonra değerlendirildi. Bevakizumab ve Pegaptanip sodyum'un farklı konsantrasyonlardaki

solüsyonları ile muamele edilen CAM örneklerinde anti-anjiyojenik etkinlik gözlenmedi (Şekil 2).



Şekil 1. Civciv koryoallantoik membran ölçümünde kullanılan döllenen yumurtalar



Şekil 2. Pegaptanip uygulaması öncesi ve sonrası (A, C), Bevakizumab uygulaması öncesi ve sonrası (B, D)

Tartışma

İlk defa 1983 yılında Senger ve ark. tarafından "tumor vascular permeability factor" (VPF) olarak tanımlanan proteinin, 1989 yılında Ferrara ve Henzel tarafından izole edilerek amino asid dizisi ortaya konan "vascular endothelial growth factor" (VEGF) ile aynı molekül olduğu anlaşılmıştır (7). Bundan sonra, VEGF ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır.

VEGF, homodimerik yapıda bir glikoprotein olup, vasküler endotelial hücrelere spesifiktir (8). Bir çok büyüme faktörü anjiyogeneze rol oynarken, VEGF-A'nın diğerlerinden farklı kritik bir rolü vardır. VEGF gen ailesinin diğer üyeleri; VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasenta kaynaklı büyüme faktörüdür (PlGF). VEGF-A'nın en az dört adet izoformu bulunmaktadır; VEGF121, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 (8,9). Bu

formlar içinde VEGF165 en çok ifade edilen izoformdur (10).

Yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD) ve diya-betik retinopati gibi bazı göz hastalıklarının patogene-zinde, VEGF-A'nın rol oynadığına dair çok sayıda insan ve hayvan çalışmaları bulunmaktadır (11,12). Ek olarak, YBMD'li hastaların koroidal neovasküler mem-branlarında yüksek konsantrasyonda VEGF-A düzey-lerine rastlanmıştır (13).

FDA tarafından YBMD'de tedavi amaçlı onaylanmış iki ilaçtan birisi olan Pegaptanip sodyum bir aptamerdir. Etkisini, VEGF-A'nın en fazla bulunan izoformu VEGF165'e bağlanıp VEGF165'in spesifik reseptörüne bağlanmasını bozarak yapmaktadır (5). Pegaptanip sodyum'la yapılan en büyük çalışma olan "VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization (VISION)" çalışması, bu preparatın kullanımının gü-venli ve sonuçlarının etkili olduğunu göstermektedir (14). Biz de bu nedenle, çalışmamızda Pegaptanip sodyum'un CAM üzerindeki etkinliğini göstermek ve anjiyogenez sürecine katkısını değerlendirmeyi amaç-ladık. Ancak, yukarıda bahsedilen büyük katılımlı çalış-malardaki olumlu sonuçların aksine, Pegaptanip sodyum'un CAM üzerinde anti-anjiyojenik etkinliğini saptayamadık. Bizim çalışmamızda, preparatın farklı konsantrasyonlarını deneme imkanımız olmadığı için daha yüksek veya daha düşük dozlardaki etkilerini değerlendiremedik. Biz de bulduğumuz sonuçları yorumlarken seçilen dozun anti-anjiyojenik etkinlik için yeterli olmayabileceğini düşündük.

FDA tarafından 2004 yılında anti-anjiyojenik etkin-liği nedeniyle ilk defa onaylanan preparat olan Bevakizumab ise, başlangıçta metastatik kolon kanser-lerinde kemoterapiyle birlikte kullanılmak üzere plan-lanmış, ancak daha sonra YBMD ve maküla ödeminde "off-label" olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir (15,16). Bevakizumab, anti-VEGF monoklonal antikor olup, doğal antikorların yüksek bağlanma affinitesi ile VEGF-A'yı bağlamaktadır. Beva-kizumab da yapılan kontrolsüz çalışmalarda, YBMD olgularında güvenle kullanılabilir ve etkin bir preparat olarak bildirilmiştir (15). Bevakizumab'ın etkinliğini biz de CAM'da göstermek istedik ve bu amaçla farklı konsantrasyonlarını hazırlayarak uygu-ladık. Sonuçlar değerlendirildiğinde, Bevakizumab'ın da CAM üzerinde belirgin bir anti-anjiyojenik etkisini gözlemedik. Bu yetersiz etkinin deney için seçilen dozların uyumsuzluklarından kaynaklandığını, ya da insan VEGF'ine karşı afinitesi yüksek preparatların civ-civ cinsinde yeterli özgüllüğe sahip olmamasına bağlı olabileceğini değerlendirdik.

Sonuç olarak, CAM modeli YBMD için kullanılabil-ecek uygun bir in vivo anjiyogenez modelidir. Diğer biyolojik modellerde olduğu gibi, CAM'da anjiyojenik amaçlı yapılacak çalışmaların da bazı dezavantajları (non-spesifik inflamatuvar reaksiyon ve neovasküleri-zasyonun dilatasyonla karışabilmesi gibi) bulunmaktadır. Ek olarak bu modelde, tür farklılıklarından kaynak-lanabilecek uyumsuzluklar da gözlenebilmesine rağmen, bu modelle çalışmak ucuz, basit, uygulama ve de-ğerlendirmesi kolay bir yöntemdir. Çalışma sonuçları ile ilgili kesin kararı verebilmek için, daha geniş kap-samlı ve daha farklı etken madde konsantrasyonlarının denendiği çalışmaların gerekli olduğunu düşünmekte-yiz.

Kaynaklar

1. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004; 112: 402-412.
2. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* 2002; 35: 227-231.
3. Norrby K. In-vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 588-612.
4. Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunnigham ET Jr, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 123-132.
5. Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degen-eration. *Retina* 2002; 22: 143-152.
6. Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int J Dev Biol* 1996; 40: 1189-1197.
7. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular disease. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 660-668.
8. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
9. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: iden-tification of a fourth molecular species and characteriza-tion of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1806-1814.
10. Lei J, Jiang A, Pei D. Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth fac-tor: VEGF183. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1443: 400-406.
11. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 964-970.
12. Kliffen M, Sharma HS, Mooy CM, Kerkvliet S, de Jong

- PT. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 154-162.
13. Kvanta A, Algvere PV, Berglin L, Seregard S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1929-1934.
 14. Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, Feinsod M, Guyer DR: VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanip for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2004; 351: 2805-2816.
 15. Michels S, Rosenfeld PJ, Puliafito CA, Marcus EN, Venkatraman AS. Systemic bevacizumab (Avastin) therapy for neovascular age-related macular degeneration: twelve-week results of an uncontrolled open-label clinical study. *Ophthalmology* 2005; 112: 1035-1047.
 16. Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA. Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (Avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* 2005; 36: 331-335.