



ARAŞTIRMA / RESEARCH

Monoklonal antikorlardan bevacizumab'ın deneysel inflamatuvar ağrı modelinde antianjiyogenik etkisi

Antiangiogenic effect of bevacizumab in monoclonal antibodies in experimental inflammatory pain model

Selma Yaman¹, Nursima Çukadar¹, Furkan Baran¹, Fatih Burak Uyanık¹, Metin Kılınc², Tufan Mert¹

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, ²Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Turkey

Cukurova Medical Journal 2019;44(Suppl 1):33-40.

Abstract

Purpose: This study aimed to investigate the possible anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-edema effects of systemic (intraperitoneal) and local (intraplantar) bevacizumab in the experimental inflammation model (introduced with Carrageenan).

Materials and Methods: Sensory functions of rats with inflammatory pain (using Carrageenan (CAR)), performed using healthy and CAR, systemically or locally anti-hyperalgesic effects of bevacizumab at different doses, using thermal plantar test (for hyperalgesia), dynamic plantar aesthesiometer (for allodynia) anti-edema effects were evaluated by measuring paw masses.

Results: The application of local intraplantar (IPL) or intraperitoneal (IP) bevacizumab in healthy rats used as controls in the studies did not cause any change in the thermal latency or mechanical threshold parameters in neurobiophysical tests. CAR application caused a decrease in mechanical threshold and thermal latency parameters and an increase in paw mass.

Conclusion: Systemic applications of bevacizumab may show more anti-hyperalgesic and anti-allodinic effects. Hyperalgesia pain following CAR application was determined by thermal latency measurements using a stimulus. The resulting hyperalgesia was effectively suppressed by systemic bevacizumab for a long time.

Keywords: Anti-hyperalgesic, anti-allodynic, anti-nociceptive, Bevacizumab, pain model.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, deneysel inflamatuvar modelinde (Carrageenan kullanılarak meydana getirilen) sistemik (intraperitoneal: IP) ve lokal (intraplantar: IPL) olarak uygulanan bevacizumab'ın muhtemel anti-nosiseptif, anti-inflamatuvar ve anti-ödem etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sağlıklı ve Carrageenan (CAR) kullanılarak gerçekleştirilen inflamatuvar ağrılı sıçanların duysal fonksiyonları termal plantar test (hiperaljezi için), dinamik plantar estesiometre (allodini için) kullanılarak, farklı dozlarda bevacizumab'ın sistemik veya lokal anti-hipernosiseptif etkileri, pençe kütleleri ölçülerek de anti-ödem etkileri değerlendirildi. Biyokimyasal analizler için sıçan pençelerinden alınan örnekler kullanıldı.

Bulgular: Kontrol olarak kullanılan sağlıklı sıçanlarda lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) bevacizumab uygulamasının nörobiyofizik testlerde termal latans veya mekanik eşik parametrelerinde herhangi bir değişime neden olmadığı görüldü. CAR uygulaması mekanik eşik ve termal latans parametresinde düşüşlere ve pençe kütlelerinde artışa neden oldu.

Sonuç: Çalışmalarımızda, bevacizumab'ın özellikle sistemik uygulamalarının daha fazla anti-hiperaljezik ve anti-allodinic etkiler gösterebileceği belirlendi. CAR uygulaması sonrası ortaya çıkan hiperaljezi, ağrılı bir uyarının kullanıldığı termal latans ölçümleriyle belirlendi. Ortaya çıkan hiperaljezi, sistemik bevacizumab tarafından etkili bir şekilde uzun süreli baskılandı.

Anahtar kelimeler: Ağrı modeli, anti-hiperaljezik, anti-allodinic, anti-nosiseptif, Bevacizumab

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Selma Yaman, Kahramanmaraş Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Turkey E-mail: korkutansel@hotmail.com
Geliş tarihi/Received: 27.02.2019 Kabul tarihi/Accepted: 17.06.2019 Çevrimiçi yayın/Published online: 23.09.2019

GİRİŞ

Ağrı; nedeni organik olan veya olmayan, kişisel deneyimler ile ilgili, sensoryal, emosyonel, hoş olmayan duygu veya deneyim olarak Uluslararası Ağrı Araştırmalar derneği (International Association for the Study of Pain=IASP) tarafından tanımlanmıştır. Ağrıyı belirleyen çeşitli faktörlerin yansırı plastisitenin ve öğrenmenin de rol üstlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir¹⁻³.

Dokuda meydana gelen zedelenme veya çevresel patojenler etkisinde ortaya çıkan inflamasyondan sonra, bu bölgede hasarlı dokulardan veya çevre dokulardan lokal olarak salınan çeşitli kimyasal maddelerin nosiseptörleri uyarmalarıyla nosiseptörlerde eşığı düşürürler ve bu durum ağrı duyarlılığında bir artışa neden olur⁴⁻⁶.

Normalde ağrı yanıtı oluşturan bir uyaran, çok daha ağrılı bir duruma (hiperaljezi), dokunma gibi ağrı oluşturmaması gereken bir uyaran ise ağrılı bir uyarana (allodini) dönüşebilir^{1,7}. Ağrının periferik algılanmasında, sensor sinir liflerinin (A ve C tipi lifler) deri ve deri altında bulunan serbest sinir sonlanmaları olan nosiseptörler çok önemli rol oynar⁸. Aβ lifleri; miyelin kılıfa sahip, sinyal iletimi hızlı, büyük çaplı liflerdir. Aδ lifleri; ince miyelin kılıfa sahip, Aβ liflere kıyasla orta kalınlıkta ve buna bağlı orta ileti hızına sahiptir. Uyarı cinsinden sınıflandırıldıklarında Aβ lifleri normal koşullarda zararlı olmayan uyarıyı iletimi ve düşük eşikli mekanik uyarılara hassasiyetleri ile Aδ lifleri ise normal koşullarda zararlı/zararsız kabul edilen uyarıyı iletimi, termal ve mekanik uyarı hassasiyetleri ile bilinirler^{3,10-13}. C lifleri; miyelin kılıfı olmayıp dolayısıyla ince ve miyelin kılıf yokluğundan yavaş iletim sağlayan liflerdir. Zararlı uyarı iletimi, mekanotermik/kimyasal uyarı hassasiyetleri ile tanımlanırlar^{3,10,14}.

İnflamasyon, immünolojik veya immünolojik olmayan yıpratıcı etkenlere karşı gelişen koruyucu özellikte bir yanıttır. Uyaran özelliği, meydana gelen doku hasarı ve gelişen cevaba bağlı olarak akut veya kronik olabilir⁶. Hızlı başlayan akut faz kısa süreli olup, tipik olarak kızarıklık, ödem, ağrı, ısı oluşumu ve lökosit cevabla karakterizedir². Kronik inflamatuvar süreç ise daha uzun süre, makrofaj yanıtla karakterize ve çoğu kez kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik bozukluklar, kemik, kas ve iskelet hastalıkları, metabolik bozukluklar, kanser, diyabetik komplikasyonlarda kendini göstermektedir^{5,6,15-17}.

Bevacizumab (molekül ağırlığı 149 kDa), vasküler

endotelial büyüme faktör (VEGF)'e spesifik bağlanan ve biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur⁴. VEGF'in aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile büyümelerini yavaşlattığı bilinmektedir¹⁸. Homodimerik, heparin-bağlayıcı glikoprotein yapısında bir molekül olan VEGF anjiogenik etkinliği yüksek olmasından dolayı onkolojik tedavilerde anti-anjiogenik ajan kullanımında dikkat çekici bir yerdedir¹⁸⁻²⁰.

Yapılan çalışmalar, inflamasyon gelişiminin otoimmün hastalıklardakine benzer birçok patolojinin temelinde yer aldığını göstermektedir. Bevacizumab'ın tümör anti-anjiyogenezi için tercih edilmesine ilişkin bulgular literatürde yer alırken, inflamasyon ve ağrı üzerine etkinliği konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Çalışmamızda, insan VEGF monoklonal antikoru bevacizumab'ın muhtemel anti-inflamatuvar, anti-ödem ve anti-nosiseptif etkilerinin araştırılması hedeflendi. Bu kapsamda, gerçekleştirilecek deneysel inflamasyon modelinde (Carrageenan kullanılarak meydana getirilen) sistemik (intaperitoneal) ve lokal (intraplantar) olarak uygulanarak nörobiyofizik sensor testler kullanımı öngörüldü. Çalışmayı destekleyecek biyokimyasal analizler planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel hayvanları

Araştırma süresince yapılması planlanan tüm uygulamalar Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSU), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından onaylandı (2015/01-03). Çalışmalar, IASP (International Association for the Study of Pain) komitesi tarafından deklare edilen kurallara uygunluğu dikkate alınarak sürdürüldü.

Çalışmamızda, KSÜ Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından üretilen, en az 8 haftalık olan ve ağırlıkları 200-230 g arasında olan 60 adet Wistar türü erkek sıçan kullanıldı. Standart kafeslerde serbestçe beslenen sıçanların, gece-gündüz ritmi ortamın 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatılmasıyla sağlandı, rölatif nemi % 40-60 olacak şekilde tutuldu. Bütün deneyler 22-24 °C oda sıcaklığında, sessiz bir ortamda, 9-14 saatleri arasında gerçekleştirildi. Sıçanlar, deney yapılmadan 5 gün önce, deney ortamına getirilerek oryantasyonları sağlandı. Aynı şekilde, sıçanların deney düzeneklerine alışmalarını sağlamak için, sıçanlar deney yapılmadan önce en az üç defa ve her seferinde 30 dakika olacak

şekilde test cihazlarında herhangi bir uygulama yapılmadan bekletildi. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalar, KSU Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı'nda, biyokimyasal analizler ise KSU Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda yapıldı.

Deney grupları aşağıdaki şekilde planlandı:

1. Sağlıklı sıçan grupları: (n=30)

İntraplantar bevacizumab uygulaması (1,25 mg ve 2,5 mg)

İntraperitoneal bevacizumab uygulaması (5 mg/kg ve 10 mg/kg)

Salin

2. İnflamasyonlu sıçanlarda uygulama grupları: (n=30)

Carrageenan + İntraplantar bevacizumab uygulaması (1,25 mg ve 2,5 mg)

Carrageenan + İntraperitoneal bevacizumab uygulaması (5 mg/kg ve 10 mg/kg)

Carrageenan + Salin

İnflamatuvar ağrı modelinin oluşturulması

Sıçanlarda, inflamatuvar ağrı Carrageenan (CAR) kullanılarak gerçekleştirildi⁷⁻⁹. CAR-inflamatuvar ağrı modeli salin içerisinde çözülün CAR'ın (2 mg/100 µl) intraplantar olarak sıçanların sağ ayak tabanlarına uygulanması ile oluşturuldu. Salin grubu sıçanlarda ise sadece aynı hacimde serum fizyolojik uygulaması yapıldı. CAR enjeksiyonundan sonra nörobiyofizik testler yapıldı.

Nörobiyofizik sensor testler

Termal plantar test

Bu test tekniğinde, radyan ısı kaynağından sıçanın pençesini geri çekme latansı ölçülerek değerlendirme yapıldı^{5,17-21}. Termal plantar ölçümlerinde, kısıtlama olmaksızın serbestçe hareket edebilen sıçanların arka pençelerine uygulanan ve deride herhangi bir hasar oluşturmadan ağrı hissi uyandıran, termal bir uyarı sonrasında hayvanın vereceği bir refleks yanıt ölçüsü olarak pençesini uyarandan geri çekme süresi (termal latans) ölçüldü.

Termal hiperaljezinin varlığı, 30 °C'ye ayarlanmış ve sabit, pürüzsüz cam zemin üzerine plastik bölmeler (10x20x24 cm) konularak oluşturulmuş termal uyarı sisteminde, hayvanın ayağını geri çekme latansı ölçülerek belirlendi. Hayvana fazla acı çektirmemek ve dokuda hasar oluşmaması için hayvan ayağını 25 saniyede (cut-off latansı, CL) çekmemişse ısı kaynağı

(8V-50W halojen ampul), otomatik olarak duracak şekilde ayarlandı.

Mekanik plantar test

Mekanik plantar test (dokunsal duyarlılık), sıçanın arka pençesine yapılacak dokunmaya karşı hayvanın gösterdiği duyarlılığın belirlenmesi için yapıldı^{17,23-27}. Mekanik plantar estesiometre sistemi, klasik von frey sisteminin otomatize edilmiş versiyonudur. Sıçanlar, gözenekli temiz metal bir zemin üzerinde tutularak, paslanmaz çelikten 0,5 mm kalınlığındaki filamentle pençeye kuvvet uygulaması yapıldı. Uygulanan mekanik kuvvet sağlıklı sıçanlarda bir ağrı uyarısı oluşturmayıp dokunma duyusu gelişimine neden oldu. Ölçülen geri çekme yanıtları, sıçanın pençesini mekanik uyarandan çektiğinde (uyarım otomatik olarak durduğunda) kaydedilen kuvvet değerleridir. Bu geri çekme yanıtları (mekanik eşik-threshold) en az 10 saniyelik aralıklarla ve 3 defa tekrarlanarak ortalaması alındı.

Ödem aktivitesinin değerlendirilmesi

Sıçanların pençesine uygulanan CAR sonrası ödem meydana geldi. Simetrik noktalar (bilekten) izole edilen sıçan pençelerinin kütlesi ölçüldü sağlıklı pençelerle kıyaslanarak araştırılan Bevacizumab'ın anti-inflamatuvar etkinlikleri hakkında veri sağlandı²¹⁻²⁵.

İlaç uygulamaları

Deneylerde kullanılan test ajanı Bevacizumab, farklı dozlarda sistemik veya lokal olarak uygulandı. Salin çalışmalarında ise test ajanı yerine eşit miktarda serum fizyolojik enjekte edildi. Deney gruplarında, Carrageenan (CAR) 2 mg/100 µl beraberinde Bevacizumab intraplantar 1,25 mg ve 2,5 mg, intraperitoneal uygulamalarda ise 5 mg/kg ve 10 mg/kg verildi.

Lokal (İntraplantar) uygulamalar

Subkutanöz intraplantar enjeksiyonda deney grupları için önce CAR'ın sıçanların sağ arka pençelerine 3. parmak hizasında plantar yüzeyin orta noktasına uygulanması ve ödem prosedürünün takibinden sonra Bevacizumab araştırılan dozlarda 1,25 mg ve 2,5 mg uygulandı.

Sistemik (İntraperitoneal) uygulamalar:

İlaçların sistemik etkileri intraperitoneal olarak yapılan enjeksiyon ile araştırıldı. Kullanılan ajanların dozları 5 mg/kg ve 10 mg/kg olarak ayarlandı.

Biyokimyasal analizler

Deney hayvanlarından elde edilen pençe doku örnekleri alındıktan sonra örnekler -80°C 'de çalışma gününe kadar saklandı. Çalışma anında örneklerin hepsi oda ısısına getirilmek suretiyle çözdürüldü ve fosfat tamponu (pH:7,2) ile 1/5 oranında dilüe edilerek homojenize (Heidolp marka, Almanya) edildi. Homojenize doku örnekleri 3500 rpm'de 15 dakika santrifüjleme işlemine tabii tutularak süpernatantları ayrıldı. Süpernatanda eliza yöntemi ile hazır ticari kitler kullanılmak Tümör nekroz faktör α (TNF- α) [Coefficientvariation (CV): % 6,21], transform büyüme faktörü β (TGF- β) (CV: % 9,1) ve interlökin 6 (IL6) (CV: % 9,46) seviyeleri (Elabscience, Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA) ölçüldü. Çalışma manuel olarak yapıldı ve Eliza cihazında (Thermo marka, USA) okundu. Bilinmeyen örneklerin hesaplanmasında Eliza cihazı tarafından standartların çalışılmasından sonra otomatik olarak verilen standart eğri ile kıyaslanmak suretiyle elde edildi.

İstatistiksel analiz

Değişkenlere ait verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Tüm ölçümler, termal latanslar ve mekanik eşikler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi. Tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında tekrarlanan ölçümlerde, tekrarlı ölçümlerde varyans analizi uygulandı. İstatistiksel parametreler ortalama \pm SD ile ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde (Statistical Package for Social Sciences 15.0, SPSS, Chicago, IL.) kullanıldı.

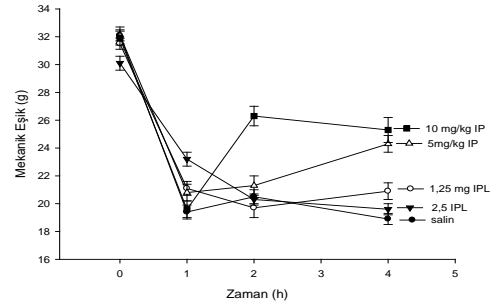
BULGULAR

Yapılan çalışmalarda salin grubu olarak kullanılan sağlıklı sıçanlarda lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) Bevacizumab uygulamasının nörobiyofizik testlerde termal latans veya mekanik eşik parametrelerinde herhangi bir değişime neden olmadığı görüldü. Aynı şekilde bu uygulamalar pençe kütlesinde de herhangi bir anlamlı değişim oluşturmadı. Öte yandan CAR uygulaması mekanik eşik ve termal latans parametresinde düşümlere ve pençe kütlesinde artışa neden oldu. Salin uygulaması sağlıklı sıçanlarda herhangi bir değişime neden olmadığından kontrol grubu olarak değerlendirildi.

1. Mekanik Eşik Parametreleri

CAR uygulamasını takiben 1 saat sonra araştırılacak ajanların uygulaması yapıldı. Salin uygulama grubunda eşik değeri zamana bağlı olarak azaldı ve uygulamadan 3 saat sonra minimum değerine ulaştı (19,3 g). CAR uygulamasını takiben ortaya çıkan allodini salin uygulamasından etkilenmemektedir.

Lokal (IPL) uygulanan Bevacizumab mekanik eşikte anlamlı bir değişiklik oluşturmazken, sistemik uygulanan Bevacizumab düşük ve yüksek dozlarda mekanik eşikte artış meydana getirdi. Uygulamadan 1 saat sonra fark anlamlı iken 3 saat sonra aradaki farkın kaybolduğu belirlendi (Şekil 1).



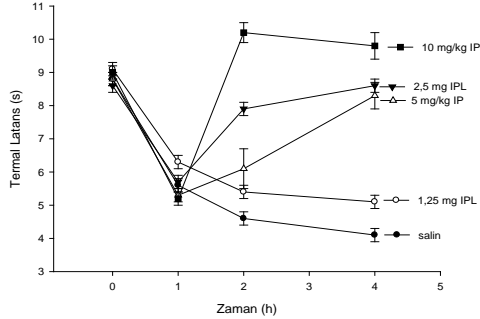
Şekil 1. İnflamasyonlu gruplarda lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın mekanik eşik üzerine etkisi

2. Termal latans parametreleri

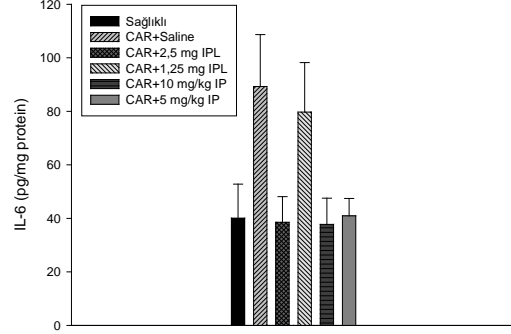
CAR uygulamasını takiben 1 saat sonra araştırılacak ajanların uygulaması yapıldı. Salin uygulama grubunda latans değeri, zaman bağlı olarak azaldı ve uygulamadan 3 saat sonra minimum değerine ulaştı (4,6 s). Termal hiperaljezinin göstergesi olan bu durum salin uygulamasından etkilenmemiştir. Bevacizumab hem sistemik hem de lokal uygulandığında doza bağlı hiperaljeziyi baskılayıcı etkinlik gösterdi. Bu baskılayıcı etkinlik zamana bağlı olarak arttı (Şekil 2).

3. Pençe kütlesi

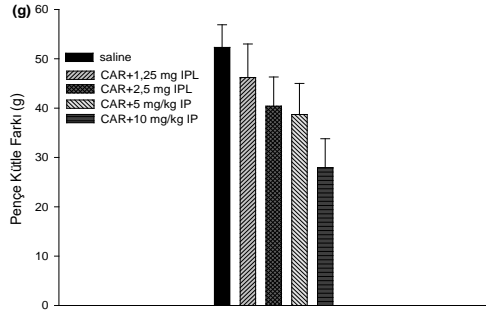
CAR uygulaması pençe kütlesinde anlamlı artışa neden oldu. Sağlıklı pençe ile inflamasyonlu pençe farkı Bevacizumab'ın etkisini değerlendirmek için kullanıldı. Özellikle sistemik Bevacizumab kütle farkını azaltarak sağlıklı pençe değerlerine yaklaşmasına neden oldu (Şekil 3).



Şekil 2. İnflamasyonlu gruplarda lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın termal latans üzerine etkisi



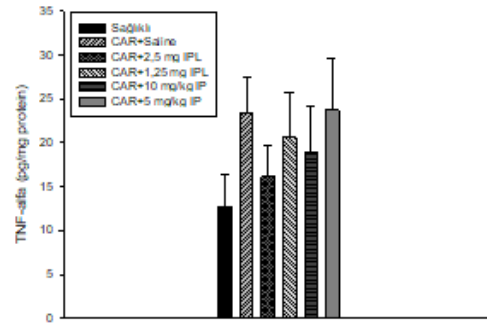
Şekil 4. Lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın IL-6 seviyesi üzerine etkisi



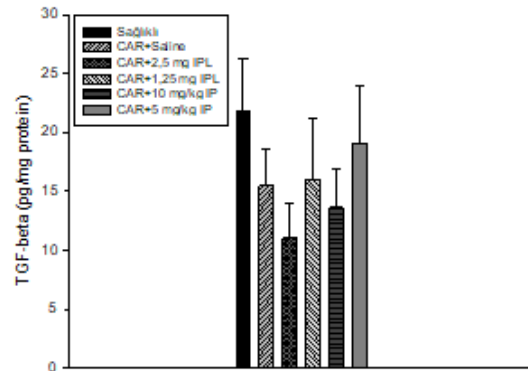
Şekil 3. Lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın pençe kütlelerine etkisi

4. Biyokimyasal parametreler

CAR uygulaması IL-6 ve TNF- α seviyesinin artmasına neden olurken TGF- β seviyesini azalmasını sağladı. İnflamasyonun temel göstergeleri olan bu biyokimyasal değerler Bevacizumab'tan farklı şekilde etkilendi. Hem lokal hem de sistemik Bevacizumab IL-6 seviyesini sağlıklı grup değerlerine yaklaştırdı. CAR uygulamasıyla artan TNF- α düzeyini lokal uygulanan Bevacizumab azaltırken diğer uygulamalar anlamlı bir değişim oluşturmadı. İnflamasyonlu grupta azalan TGF- β seviyesini sistemik uygulamalar kısmen arttırdı (Şekil 4-5-6).



Şekil 5. Lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın TNF- α seviyesi üzerine etkisi



Şekil 6. Lokal (intraplantar: IPL) veya sistemik (intraperitoneal: IP) uygulanan Bevacizumab'ın TGF- β seviyesi üzerine etkisi

TARTIŞMA

Bu çalışma; deneysel inflamatuvar ağrı modeli kullanılarak elde edilen verilerin inflamasyon sürecinin ortaya çıkışından başlayarak gelişim ve azalmasına kadar devam eden süreçlerde bevacizumab'ın etkinliğinin daha iyi anlaşılması ve tedaviye yönelik yeni yaklaşımları gündeme getirmesi düşüncesiyle yapılmıştır. Nosisepsiyon; ağrının da kapsamı içine girdiği, vücudun herhangi bir bölgesinde gelişen bir doku hasarını takiben lokal olarak salınan mediyatörlerin özelleşmiş sinir uçları olan nosiseptörleri uyarmasıyla başladığı olaylar dizisine karşılık gelir^{2,5}.

Nosiseptif süreçlerin başlangıç noktası, primer afferent nosiseptörlerdir. Bunlar mekanik, termal ve kimyasal uyarılara yanıt veren sinir uçlarıdır ve nosiseptörün yanıt özelliklerine bağlı olarak spinal korda doğru bilginin iletimi meydana gelir².

Çalışmada, CAR kullanılarak meydana getirilen inflamatuvar ağrı modelinde lokal (intraplantar: IPL) ve sistemik (intraperitoneal: IP) olarak uygulanan bevacizumab'ın anti-nosiseptif ve analjezik etkileri; biyofizik sensor testlerle, anjiyogenez üzerindeki etkinliği biyokimyasal analizlerle ve sağlıklı pençe ile kıyaslanarak da anti-ödem etkileri araştırıldı.

Anjiyogenez, önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşturulduğu fizyolojik bir süreçtir. Anjiyogenik moleküller içinde vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) en önemlisi olma rolü ile anjiyogenezde etken dominant bir faktördür. VEGF; endotel mitogenezinin uyarılması, hücre uyarılması/göçü, vasküler geçirgenliğin kontrolü gibi birden fazla olayda elzem görevlere sahiptir²⁸. Anjiyogenez ve inflamasyon birbirlerini etkileyebilecek düzeyde yakın ilişkide olan önemli fizyolojik olaylardır^{28,29}. Anjiyogenik faktörler, pro-anjiyogenik ve pro-inflamatuvar fonksiyon gibi iki önemli fizyolojik role sahipken, diğer taraftan pro-inflamatuvar sitokinler de inflamasyonu tetikleyerek anjiyogenez üzerinde etkindir^{28,29}.

Bunların yanı sıra inflamatuvar süreç; sitokin üretimi, damar geçirgenliğinin artması, anjiyogeneze dair hücre çoğalması, büyümesi ve mobilizasyonu gibi olaylara neden olur^{28,33}. Yakından ilişkili bir diğer durum ise meydana gelebilecek bir kronik inflamatuvar süreç, artan oksidatif stres ile ilişkilidir ve oksidatif stresin indüklenmesi pro-inflamatuvar etkilere neden olur^{32,33}.

Bevacizumab, VEGF'e spesifik olarak bağlanan ve

biyolojik aktivitesini nötralize eden bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Özellikle kanser tedavilerinde VEGF'nin biyolojik aktivitesini ortadan kaldırarak tümörlerin damarlanmalarını ve büyümelerini yavaşlattığı gösterilmiştir. Ayrıca, daha önceki çalışmalar, bevacizumab'ın anti-anjiyogenik etkinliğinin inflamatuvar süreçlerde de önemli roller oynayabileceğini işaret etmektedir^{31,34, 36,37}.

Çalışmamızda, bir rekombinant hümanize monoklonal antikor olan Bevacizumab'ın özellikle sistemik uygulamalarının daha fazla anti-hiperaljezik ve anti-allojinik etkiler gösterebileceği belirlendi. CAR uygulaması sonrası ortaya çıkan hiperaljezi ağrılı bir uyarının kullanıldığı termal latans ölçümleriyle belirlendi. Ortaya çıkan hiperaljezi sistemik Bevacizumab tarafından uzun sayılabilecek bir süre boyunca etkili bir şekilde baskılandı. Ağrısız bir uyarana yanıtların ortaya çıkması olarak tanımlanan allojin oluşumu ise mekanik plantar test yardımı ile eşik değerleri ölçülerek araştırıldı. Yine sistemik bevacizumab anlamlı düzeyde azalan eşik değerini yükselterek anti-allojinik etkiler ortaya çıkardı.

Bu çalışmada bevacizumab'ın, pro-inflamatuvar sitokinlerden biri olan IL-6 üzerindeki etkileri açısından çok dikkat çekicidir. TNF- α düzeyinde çok da belirgin olmayan bu etki, Bevacizumab'ın etki mekanizmasını açıklamak için dikkate alınması gereken önemli bir veridir. Bevacizumab inflamatuvar reaksiyonda aratan IL-6 seviyesini baskılayarak anti-inflamatuvar etkilerini ortaya çıkarmış olabilir. Literatürde yer alan bevacizumab'ın IL-6 üzerindeki etkisini destekleyen çalışmalara ek olarak baskılayıcı etkisini göstermiş olmamız buradaki rolünü güçlendirmektedir. bevacizumab'ın etkilerinde, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 'nin muhtemel rolü de araştırmalara konu edilmektedir³⁴. Kısmen de olsa aratan TGF- β seviyesi daha ileri araştırmalara konu edilebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, genel çalışma amacı ışığında bakıldığında, veriler Bevacizumab'ın uygulama şekline bağlı olarak oldukça etkili bir anti-inflamatuvar olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız, pro-inflamatuvar sitokinler üzerindeki etki mekanizmasını açıklamak için önemli bir yol gösterici olabilir. Çalışmada kullanılan doz aralıklarının artırılması çalışmanın daha iyi analiz edebileceğini göstermektedir. Yapılması planlan an moleküler çalışmaların sunacağı farklı bakış açıları ile bevacizumabın etki mekanizması hakkında daha ayrıntılı verilere ulaşılabilecektir.

Yazar Katkıları: Çalışma konsepti/Tasarımı: TF, MK, SY, NÇ, FB, FBU; Veri toplama: TM, NÇ, FB, FBU; Veri analizi ve yorumlama: TM, MK, SY, NÇ, FB, FBU; Yazı taslağı: SY; İçeriğin eleştirel incelenmesi: TM; SY, NÇ, FB, FBU, MK, TM. Son onay ve sorumluluk: SY, NÇ, FB, FBU, MK, TM; Teknik ve malzeme desteği: -; Süpervizyon: SY, TM; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Projemiz TÜBİTAK (2209-A kapsamında) tarafından desteklenmiştir.

Author Contributions: Concept/Design : TF, MK, SY, NÇ, FB, FBU ; Data acquisition: TM, NÇ, FB, FBU; Data analysis and interpretation: TM, MK, SY, NÇ, FB, FBU; Drafting manuscript: SY; Critical revision of manuscript: TM, SY, NÇ, FB, FBU, MK, TM. Final approval and accountability: SY, NÇ, FB, FBU, MK, TM; Technical or material support: -; Supervision: SY, TM; Securing funding (if available): n/a.

Informd Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Project has been supported by TÜBİTAK (2209-A)

KAYNAKLAR

- Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet*. 1999;353:1607-9.
- Bars DL, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 2001;53:597-652.
- Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*. 2009;507-511.
- Andrew D, Greenspan JD. Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat. *J Neurophysiol*. 1999;82:2649-56.
- Fechoa K, Nackley AG, Wu Y, Maixner W. Basal and carrageenan-induced pain behavior in Sprague-Dawley, Lewis and Fischer rats. *Physiol Behav*. 2005;85:177-86.
- Türk Farmakoloji Derneği XXII. Eğitim Toplantısı Doğu Akdeniz Farmakoloji Topluluğu (DAFT) İşbirliğiyle İnflamasyon ve Ağrı 29 Mayıs 2015 Çukurova Üniversitesi Akif Kansu Toplantı Salonu, Balcalı, Adana.
- Aydın ON. Ağrı ve ağrı mekanizmalarına güncel bakış. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002;3:37-48.
- Kayhan Z. Klinik Anestezi. 2. Baskı İstanbul, Logos Yayıncılık, 1997
- Kidd BL, Urban LA. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth*. 2001;3-11.
- Güneş Y, Mert T, Özcengiz D, Günay İ. Ağrının iletilmesinde N-metil D-aspartat reseptörlerinin rolü. *Cukurova Medical Journal*. 2012;37:9-16.
- Martin TJ, Eisenach JC. Pharmacology of opioid and nonopioid analgesics in chronic pain states. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299:811-7.
- Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol Rev*. 2003; 55:1-20.
- Hargreaves K, Dubner R, Broun F, Flores C, Joris J. A New and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1998;32:77-8.
- Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999;1-164.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438:932-6.
- Çukadar N, Baran F, Özsoy KE, Uyanık FB, Sürer T, Mert T et al. Nociceptive effects of locally treated metoprolol. *Cukurova Medical Journal*. 2015;40:258-66.
- Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Hematol*. 2001;106:148-56.
- Nazmiye E. Vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-VEGF ajanlar. *Retina Vitreus*. 2007;15:35-40.
- Shih T, Lindley C. Bevacizumab: An angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther*. 2006;28:1779-1802.
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*. 1991;47:211-8.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266:11947-54.
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*. 1992;13:18-32.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
- John EH. Guyton and Hall Medical Physiology. Baltimore, Elsevier, 2010.
- Mert T, Ocal I, Gunay I. Pain relieving effects of pulsed magnetic fields in a rat model of carrageenan-induced hindpaw inflammation *Int Rad Biol*. 2014;95-103.
- Mert T, Oksuz H, Tugtag B, Kilinc M, Senoglu N, Bilgin R. Modulating actions of NMDA receptors on pronociceptive effects of locally injected remifentanyl in diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2014;66:1065-1072.
- Mert T, Gunes Y, Gunay I. Local analgesic efficacy of tramadol following intraplantar injection. *Eur J Pharmacol Eur*. 2007;558, 68-72.
- Cébe SS, Zehnder-FA, BallmerHK. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63:601-15.
- Noonan SA, Morrissey ME, Martin P, Biniacka M, Ó'Meachair S, Maguire A et al. Tumour vasculature immaturity, oxidative damage and systemic inflammation stratify survival of colorectal cancer patients on bevacizumab treatment. *Oncotarget*. 2018;9:12,105-36.
- Ribatti D. The inefficacy of antiangiogenic therapies. *J Angiogenes Res*. 2010;2:27.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420:860-7.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
- Kong SY, Bostick RM, Flanders WD, McClellan WM,

- Thyagarajan B, Gross MD et al. Oxidative balance score, colorectal adenoma, and markers of oxidative stress and inflammation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23:545-54.
34. Arimura S, Takamura Y, Miyake S, Gozawa M, Iwasaki K, Tomomatsu T et al. The effect of triamcinolone acetonide or bevacizumab on the levels of pro-inflammatory cytokines after retinal laser photocoagulation in pigmented rabbits. *Exp Eye Res.* 2016;149:1-7.
35. Qu CY, Zheng Y, Zhou M, Zhang Y, Shen F, Cao J et al. Value of bevacizumab in treatment of colorectal cancer: A meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015;21:5072-80.
36. Klein A, Loewenstein A. Therapeutic monoclonal antibodies and fragments: Bevacizumab. *Dev Ophthalmol.* 2016;55:232-4.
37. Amoaku WMK, Saker S, Stewart EA. A review of therapies for diabetic macular oedema and rationale for combination therapy. *Eye.* 2015;29:9,1115.