

Anjiogenezis

Şeref Olgar¹, Sevgi Yetgin²

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi ¹Pediyatri Yardımcı Doçenti, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ²Pediyatri Profesörü

SUMMARY: Olgay S, Yetgin S. (Department of Pediatrics, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey). Angiogenesis. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003; 46: 139-147.

Angiogenesis is a complex biologic process that occurs normally in development and in turnover and remodeling of mature vascular networks. Pathological angiogenesis and neovascularization occur in association with tumor growth and metastasis, developmental disorders, and ischemic diseases. The role of angiogenesis in hematological diseases remains unknown. We evaluated angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic diseases.

Key words: angiogenesis, hematologic diseases, vascular endothelial growth factor, antiangiogenic therapy.

ÖZET: Anjiogenezis normalde matür damar ağının gelişim ve değişiminde görülen kompleks biyolojik bir olaydır. Patolojik anjiogenezis ve yeni damar oluşumu; tümör büyüme ve metastazında, gelişimsel hastalıklarda, iskemik hastalıklarda oluşur. Hematolojik hastalıklardaki anjiogenezisin rolü tam bilinmemektedir. Bu makalede hematolojik hastalıklarda anjiogenezis ve antianjiogenik tedavi özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: anjiogenezis, hematolojik hastalıklar, antianjiogenik tedavi.

Anjiogenezis yeni kapiller damar gelişimi olup embriyonik gelişme, yara iyileşmesi ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylar döneminde görülmektedir. Ancak kontrolsüz anjiogenezis birçok patolojik durumun varlığında; diyabetik retinopati, ateroskleroz, kronik enflamasyon, tümör büyümesi ve metastazından sorumlu tutulmaktadır. Anjiogenezis ekstrasellüler matriks, solubl faktör ve hücreler arasındaki etkileşim sonucu; endotelial hücrelerin differansasyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile seyreden kompleks bir işlemdir¹.

Anjiogenezis birçok neoplastik ve non-neoplastik hastalığın ilerlemesinden ve etiyopatogenezinden; özellikle solid tümörlerin büyüme ve metastaz yapmasından sorumlu tutulmaktadır. Tümörde hipervaskülarizasyonun başlangıçtaki bir enflamatuvar olaya cevap veya tümörün nekrotik ürünlerine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür².

Çoğu insan tümörü başlangıçta aylarca, hatta yıllarca vaskülarizasyonsuzdur. Fakat sonra vaskülarize olur ve hücre alt grupları anjiogenetik fenotipi başlatır. Prevasküler dönemde tümör iyi perfüze olur, nadiren 2-3 mm³ ten büyük ve

milyon veya daha fazla hücre içerir. Prevasküler dönemde veya mikrometastaz döneminde hücreler hızla çoğalır, genişler, vaskülarize olur; yeni damar oluşumu yeterli olmazsa hücreler nekroza uğrar².

Anjiogenezisi düzenleyen pozitif ve negatif regülatörlerin varlığıdır. Tümör hücreleri bir veya daha çok pozitif regülatörle uyarıldığında anjiogenik protein ekstrasvasküler matrikse geçer ve anjiogenezisi başlatır. Kanserli hastaların biyopsi örneklerinde anjiogenezisi saptanması metastaz veya rekürens tahminini sağlar².

Hematolojik malignansilerde de anjiogenezisin prognostik rolü vardır. Kemik iliğinin lenfoid dokuya benzediği kabul edilmektedir. Lenf nodu, karaciğer, dalak ve lenfohematopoetik doku büyümesi ve fonksiyonu intravasküler yataktaki dolaşıma bağlıdır³.

Hemopoiezis, vaskülogenezis ve anjiogenezis

Vasküler ve hematopoetik doku, "yolk sac" kan adacıklarından oluşur. Dış tabakadaki anjioblastik form multipotent hematopoetik hücreler dokuyu sarar. Anjioblast ve multipotent hematopoetik

hücreler oluşur ve her ikisinde de CD34 pozitifdir. Endotelial hücre dizilerinde multipotent mezodermal hücrelerinin kaderini belirleyen gen tanımlanmıştır^{4,5}.

Varlığı düşünülen vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF); VEGF (B,C,D), VEGF bağlı moleküller (plasental growth faktör (PIGF)) ve diğer büyüme faktör reseptörleri (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) normal kan damarlarının gelişmesinde önemlidir⁶⁻¹⁰. Vaskülogenezis için mezodermal prekürsörlerin anjioblastlara ve onların da endotelial hücrelere dönüşüm sırası gereklidir¹¹. Bununla vaskülogenezisin erken embriyogenezis ile sınırlı olduğu; erişkinlerde olmadığı şeklinde yorumlar yapılmaktaydı^{11,12}. Ancak son çalışmalarla vaskülogenezisin erken embriyogenezis ile sınırlı olmadığı, bunun sağlıklı ve hasta erişkinlerde fizyolojik ve patolojik olaylarda rolünün olabileceği vurgulanmaktadır¹³.

Fizyolojik ve patolojik anjiogenezis

Fare embriyoları ile yapılan deneyler VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörlerin (bFGF) vasküler gelişimin başlaması için esas olduğunu göstermektedir^{6,10}. Vasküler duvarın şekillenmesi ve yayılımı tirozin kinaz reseptörleri (tie-1 ve tie-2) tarafından da kontrol edilmektedir⁸. Diğer çalışılan faktörler ise VEGF ile tie-2'e bağlı angiopoetin-1 ve 2'dir. VEGF ile angiopoetin-2 anjiogenezise yol açarken angiopoetin-2'nin ortamdan çekilmesi kapiller regresyona yola açmaktadır¹⁴. Angiopoetin-1 esas olarak olgun damar idamesinden sorumludur. Angiopoetin-1 veya tie-2'deki mutasyonlar yetersiz damar duvar ve anormal kalp gelişimine sahip embriyo oluşumuna yol açabilirler^{11,12,15}. Spesifik tie-2 mutasyonun düz kas eksikliği ve mikroanevrizma ile birlikteliği gösterilmiştir¹⁶.

Normal koşullarda anjiogenezis endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonunu sağlayan faktörler ile, buna karşı gelen anti-anjiogenik faktörler arasında oluşan bir denge ile gerçekleşir. Fizyolojik neovaskülarizasyon kendi kendini sınırlayan bir olay olmasına rağmen patolojik anjiogenezis uzun dönem devam eder. Bu durum romatoid artrit (RA), psöriazis, retinopati gibi farklı hastalıklarda görülmektedir².

Akut promiyelositer lösemi (APL) hastalarında yapılan in vitro çalışmalarda VEGF'nin GM-CSF'yi (granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör) stimüle ettiği, M-CSF (makrofaj-CSF), G-CSF (granülosit-CSF), interlökin-6 (IL-6), stem cell

faktör üretimine neden olduğu umbilikal ven endotelial hücrelerinde gösterilmiştir. Bütün bu sitokinlerin lösemik hücreler için çoğalmayı uyarıcı potansiyeli olduğu sanılmaktadır. VEGF, lokal hipoksi, tümör basısı ve iskemiye bağlı olarak da oluşur. İskemik kalp hastalıklarında da aynı etki ile kolleteraller oluştuğu gösterilmiştir. Aterosklerotik plaka ve lokal hipoksiye bağlı aşırı VEGF üretimi plak rüptürü ve plak büyümesine yol açtığı belirtilmektedir¹⁷.

Romatoid artritte aşırı anjiogenik faktör üretimi, makrofaj, immün hücre ve pannüs oluşumuna bağlanmıştır. Psöriazisli hastalarda hipervasküler deri lezyonları IL-8 polipeptiddeki artış ve trombospondinin (TSP) az salımına bağlanmıştır. Ayrıca araştırmalarda TSP-2'nin de kutanöz enflamasyon, geç tip hipersensitivite reaksiyonları kontrolünde rol aldığı gösterilmiştir. TSP-2'nin enflame derideki dermal fibroblast ve mikrodamarlar tarafından kontrol edildiği sanılmaktadır. TSP-2 yokluğunda; anjiogeneziste artma, ödem ve enflamatuvar cevabın arttığı gösterilmiştir¹⁸. Hayvan ve insan peptik ülserlerinde ülser yatağında mikrodamar eksikliği ve insan gastrik ülserinde bFGF düzeyinin normal mukozadan 23 kat az olduğu gösterilmiştir. Hayvan çalışmasında ise oral asit rezistan FGF verildiğinde ülser yatağındaki anjiogenezisi arttırıp ülser iyileşmesini indüklediği gösterilmiştir².

Ovülasyon, uterusun menstrual siklusu, plasentanın oluşumu fizyolojik anjiogenezise bağlıdır. Endojen anjiogenik stimulator veya inhibitör disfonksiyonunda kadınlarda uzamış menstrüel kanama ve infertilite gözlemlendiği belirtilmektedir². Gelişimsel anjiogenezis bozukluklardan bazıları; barsak atrezisi, vasküler malformasyon, hemanjioma ve tek taraflı fasial atrofidir. Preeklampsi hastalarında VEGF'nin hipoksiye bağlı artışı bulunmuş ve bu artışın hastalığın ciddiyetini yansıttığı gösterilmiştir¹⁹. Ayrıca anjiogenik gelişme bozukluğunun ultrasonografi ile değerlendirilebileceği ve gelecekte magnetik rezonans görüntüleme (MRI) ile daha fazla bilgi verilebileceği belirtilmiştir.

İnsanlardaki anjiogenezisin proanjiogenik ve antianjiogenik faktörlerin dağılımına bağlı geliştiğine inanılmaktadır^{2,20-26}. Tablo I'de şüphelenilen proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler gösterilmiştir.

Anjiogenezis, integrin ve apoptosis

Anjiogeneziste adezyon moleküllerinin büyük rolü olduğu bilinmektedir. Yeni kapiller oluşumu

Tablo I. Şüphelenilen proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler

Proanjiogenik faktörler	Antianjiogenik faktörler
VEGF (vasküler endotelial büyüme)	Endostatin, vazostatin
VEGF-B	Angiostatin
VEGF-C	γ -ve α interferon
VEGF-D	Thrombospondin (TSP)
Asidik ve bazik FGF (fibroblast büyüme faktörü)	Fibronektin
Angiogenin	Trombosit faktör 4 fragment
Angiopoetin-1	Epidermal büyüme faktörü fragmenti
"Transforming growth" faktörleri (TGF- α ,TGF- β)	Doku metalloproteinaz inhibitörleri
Tümör nekrozis faktör (TNF- α)	Retinoik asit
Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF)	Talidomid
Trombosit kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörleri	İnterlökin-1
HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1)	İnterlökin-12
Bradikinin ve türevleri	Anti-VEGF
İnterlökin-2	Toremifene sitrat
İnterlökin-6	NM-3
İnterlökin-8	TNP-470
G-CSF (granülosit koloni stimulan faktör)	Kortikosteroidler
GM-CSF (granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör)	Tip-1 kollojen peptidleri
EGF (Epidermal büyüme faktörü)	Anjiostatin plazminojen fragmenti
IGF-1 (İnsulin-like growth faktör)	Prolaktin
Hepatosit büyüme faktörü	XVIII-kollojen fragmenti
Plasental büyüme faktörü	β HPP (N-benzyl-N-hydroxy-5-phenylpentamidine)
Vitaxin α V β 3	Anti-vitaxin, Anti- α V β 3
12-lipoksijenaz (12-LOX)	Arsenik trioksit

sırasında "growth" faktör reseptörleri ve integrinlerin oluşturduğu sinyaller endotelial hücre proliferasyon ve invazyonunu koordine etmektedir. Farklı araştırmacılar tarafından artmış anjiogenezisin kontrolünde "growth" faktörleri, onların reseptörleri ve integrinler konusunda farklı görüşler ileri sürülmüştür. Anjiogenezisi belirleyen önemli integrinlerden biri α V β 3 ve α V β 5 integrindir^{27,28}. Bir çalışmada anti- α V β 3 kullanımı tümör büyümesini sınırlandırdığı gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar bFGF ile anti- α V β 3 integrin kombinasyonu ile korneal anjiogenezis gelişimini inhibe etmiştir²⁹.

Birçok deneysel çalışmada korneanın TNF- α ve anti- α V β 3 ve anti- α V β 5 inkübasyonu ile anjiogenezisin inhibe olduğu gözlenmiş, bFGF ve TNF- α 'nın α V β 3 ve α V β 5 integrin yoluyla aktive olduğu yorumu yapılmıştır². Ayrıca α V β 3 ve α V β 5 integrinlerin p53 tümör süpresör gen aktivitesini süprese ederek endotelial hücre koruyucu sinyallerle anti- α V β 3, TNF ve interferon kokteyl kullanımı ile malign melanoma hücrelerinde hücre ölümüne ve anjiogenezisin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir^{30,31}. Bu da bu iki sitokininin malign melanomadaki anjiogenezis kontrolündeki rolünü vurgulamakta ancak nasıl yaptığı bilinmemektedir.

Anjiogenezis ve lenfanjiogenezis

Çeşitli VEGF'lerinin hem vasküler ve hem de lenfatik endotelial reseptör üzerine etkisi bilinmesine rağmen tümörlerin lenfatik proliferasyonunda da bir eksiklik vardır. Bu durum birkaç şekilde açıklanmaktadır:

1. Lenfatikler VEGF reseptörlerine sahip değildir. Ancak VEGF-3'ün keşfedilmesi ile yapılan çalışmalar (VEGF-C ve VEGF-D ile aktive edilmiş spesifik lenfatik endotelial reseptör) bunu desteklemektedir^{9,32,33}.
2. VEGF-C ve VEGF-D lenfoendotelial kemotaktik faktör üretiminden çok lenfatik invazyon ve tümör metastazına yol açmaktadır. İnsan lenfoma hücrelerindeki VEGF-C ve VEGF-D'nin gösterilmesi bunu desteklemektedir⁹.
3. İnsan tümörlerindeki lenfatik duraklama yüksek intersitisiyel tümör basısına bağlı olabilir ve bu da intratümoral lenfatik tıkanmaya yol açmaktadır. Ayrıca teknik olarak gösterilememiş olabilir.

Son yıllardaki VEGFR-3 spesifik prob çalışmaları insan tümöründeki lenfoanjiogenezis konusunda daha çok bilgi verici olarak gözükülmektedir³⁴.

Farklı tümörlerdeki neovaskülarizasyon ve neolenfoanjiogenezis karşılaştırması ilginç olacaktır.

Hematolojik malign hastalıklarda anjiogenezis

Kemik iliği kan akımı artışı kemik iliğindeki anjiogenesis artışı ile birliktedir. Solid tümörlerdeki gibi lösemi patogenezinde de anjiogenezisin önemli olduğu vurgulanmaktadır¹⁷.

Lökosit sayısı yüksek akut miyeloblastik lösemili (AML) hastalarda VEGF artışının prognostik gösterge olduğu, lökosit sayısı yüksek hastalarda remisyon hızı ile negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir³⁵.

Lenfopoietik tümörlerde artmış anjiogenezisin, hematolojik hücrelerden VEGF, bFGF salınımına ve üretimine bağlı olduğu yorumu yapılmaktadır. Bu hücreler; CD34 hücre, monosit, T-cell, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve megakaryositlerdir³⁶⁻⁴⁰. Yüksek trombosit sayısı ile serum VEGF ve bFGF düzeyi 58 kanser hastasında kıyaslandığında yüksek trombosit veya lökositle bFGF arasında ilişki kurulmamasına rağmen VEGF ile PLT yüksekliği arasında ilişki görülmüştür⁴¹. Erişkin 20 AML hastası ve 20 kontrol hastasında endotelial hücre göstergeleri (ULEX-E ve VWF) ile yapılan çalışmalarda anjiogenezisin AML patogenezinde rol oynadığı, anjiogenezis inhibisyonunun AML tedavisinde yeni strateji olması gerektiği vurgulanmıştır⁴². Farklı bir çalışmada ise 62 AML hastası normal kontrol hastaları ile karşılaştırıldığında; "microvascular density" (MVD) yüksek bulunmuştur. İndüksiyon tedavisinin 16. gününde MVD'nin %60 azalmış olduğu, tam remisyonunda ise MVD'nin kontrole benzer oranda olduğu görülmüştür. Ayrıca hastaların %75'inde MVD'nin kontrol hastalarının iki-üç katı yüksek olduğu görülmüş, MVD'nin AML hastalarının klinik izlemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir⁴³.

Akut promiyelositer lösemi (APL) hastalarının kemik iliği aspirasyonunda anormal promiyelosit proliferasyonu ve artmış anjiogenezis artışı VEGF artışı ile gösterilmiştir. All-trans retinoik asid (ATRA) tedavisinin bu hastalarda VEGF üretimini inhibe ettiği ve MVD'yi düşürdüğü gösterilmiştir. Ayrıca APL hastalarında görülen koagülasyon anormalliklerinin önemli bir nedenin "doku faktörü" (tissue factor) olduğu, VEGF'nin doku faktör ekspresyonunu artırarak kanama diyatezine neden olabileceği vurgulanmaktadır. ATRA

tedavisi ile APL hastalarında remisyon hızının yüksek olması nedeni ile ATRA'nın anti-anjiogenik faktör olduğu sanılmaktadır¹⁷.

Birçok araştırmacı neovaskülarizasyonun erişkin ve çocuk akut lenfoblastik lösemi, kronik miyelositer lösemi (KML), miyelodisplastik sendrom (MDS), lenfoma, miyeloma, kronik lenfositer lösemideki (KLL) rolünü farklı yöntem ve farklı endotelial göstergeler kullanılarak araştırmışlardır. Yeni tanı konmuş 40 ALL'li çocuk hastası kemik iliği biyopsisinden yapılan çalışmada ALL hastalarında kontrole göre belirgin olarak MVD artışı saptanmıştır⁴⁴.

Ayrıca 22 ALL hastalık çalışmada üriner bFGF ölçümü hastaların tümünde yüksek bulunmuştur. Fakat yeni tanı konmuş ile komplet remisyon girmiş hastaların bFGF düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmamış, morfolojik ve biyolojik parametrelerden FAB sınıflandırması, immünofenotipik veriler, proliferasyon indeksi, sitogenetik gene mutasyon ve translokasyon ile artmış anjiogenezis karşılaştırılmamıştır. Ayrıca bu çalışmada üriner bFGF ölçümü azalmış, tümör yükünde azalmış fakat yeni tanı almış ile tam remisyon girmiş hastalar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. bFGF artışı diğer birçok patolojik durumda özellikle enfeksiyon ve hücre proliferasyonda yüksek olduğu saptanmıştır^{37,45}.

Yetgin ve arkadaşlarının⁴⁶ 31 ALL ve 10 kontrol çocuk hastada yaptığı çalışmada; serum VEGF düzeyi tanı anında kontrol ve remisyon dönemindekinden düşük bulunmuş, remisyon döneminde kontrol grubunun oranına yükselmiştir. bFGF oranı tanı anında kontrol grupla aynı oranda ancak remisyonunda ise düşük bulunmuştur. Aynı çalışmada trombosit sayısı düşük olanlarda VEGF ve bFGF düzeyleri trombosit sayısı yüksek olanlardan düşük bulunmuştur. Hepatosplenomegalinin varlığı ile de "growth" faktör oranları artmıştır.

Aguayo ve arkadaşları⁴⁷ MDS, AML, ALL, KML, KLL den oluşan 82 erişkin ve 17 kontrol hastasının kemik iliği biyopsilerinden yaptıkları çalışmada KML ve MDS hastalarının kan damar sayısında anlamlı artış göstermelerine rağmen; AML, ALL ve KLL hastalarının kemik iliği biyopsilerinde kontrole göre anlamlı değişiklik görmemişlerdir.

Kronik lenfositer lösemi hastalarının kemik iliği aspirasyonunda yapılan çalışmalarda artmış üriner bFGF ve VEGF ile MVD arasındaki ilişki

araştırıldığında MVD'nin kontrol grubun yaklaşık iki katı olduğu ölçülmüştür⁴⁸. Farklı bir çalışmada ise PCR yöntemi ile 28 AML hastanın 20'sinde, beş sekonder AML hastasının üçünde VEGF tespit edilmiştir⁴⁹.

Aguayo ve arkadaşları⁴⁷ ALL, KLL, MDS hastalarından alınmış 145 kemik iliği aspirasyonunda MVD ve 417 serum örneğinden VEGF, bFGF, TNF-alfa, "hepatosit growth faktörü" (HGF) çalıştıklarında KLL hastalarının kemik iliği aspirasyonunda vaskülaritenin MDS ve lösemilerden yüksek olduğunu göstermişlerdir. KML hastalarında yüksek sayıda kan damarı ve geniş vasküler alan bulunmuştur. KML, KLL, KMML ve MDS'de VEGF, bFGF ve HGF anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak HGF, TNF-alfa ve bFGF ALL hastalarında VEGF kadar yüksek bulunmamıştır. TNF-alfa AML ve MDS'de önemli yüksek bulunmuş, TGF-alfa hiçbir lösemi veya MDS'de anlamlı yüksek bulunmamıştır. Yüksek plazma VEGF; KML'de bFGF ise KLL'de bulunmuş ve sonuç olarak artmış vaskülaritenin MDS ve lösemili hastalarda lökemojenik rolünün olabileceği vurgulanmıştır⁵⁰.

Aynı araştırmacılar yeni tanı ve tedavi almış beyaz küre sayısı yüksek 99 AML hastasında VEGF ile WBC arasında, artmış VEGF düzeyi ile kısa "survey" arasında ilişki kurmuşlar, AML hastalarında yüksek beyaz küre sayısı ve blast sayısı ile birlikte sellüler VEGF düzeyinin hastalığın gidişi hakkında bilgi verici olduğu belirtilmiştir⁵¹.

Multipl miyelomalı hastaların kemik iliği aspirasyonunda artmış anjiogenezis ile hücresele proliferasyon arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiş⁵², ancak bunun tersine farklı bir çalışmada multipl miyelomalı hastaların stem cell transplantasyonu sonrası kapiller proliferasyonun devam ettiği, ayrıca tam remisyondaki hastalarda anjiogenezisin arttığı gösterilmiştir⁵³.

Ekstramedüller lösemik tutulum ile kemik iliği aspirasyonunda anjiogenezis arasında korelasyon çoğu çalışmada yoktur. Kronik miyelomonositer lösemi (KMML) ve MDS'li ekstramedüller tutulumu olan 16 hastada yapılan çalışmada ise iki KMML-lökemia kutis ve bir KMML-mesane koloroma hastasında kemik iliği ve doku MVD düzeyi yüksek bulunmuş ve artmış anjiogenezisin ekstramedüller "lösemik depozit" oluşumunda önemli rol oynadığını vurgulanmıştır. Ancak çalışmadaki hasta sayısı analiz için yetersiz bulunmuştur⁵⁴.

Erişkin 60 T cell lösemili hasta ve 26 sağlıklı kontrol hastasında yapılan çalışmada VEGF düzeyi

ile ekstranodal tutulum arasındaki ilişki incelendiğinde 14 hastada deri tutulumu, bir hastada santral sinir sistemi tutulumu, bir hastada kemik, bir hastada asit, bir hastada plevral effüzyon, bir hastada splenik tutulum ve bir hastada multipl organ tutulumu saptanmıştır⁵⁵. Ayrıca KMML'li hastalarda kemik iliği aspirasyonunda anjiogenik "hot-spots" ile ekstramedüller lösemik infiltrasyon arasında pozitif korelasyon bulunmuştur⁵⁶.

Miyelofibrozis ile miyeloid metapilazili (MMM) 114 hasta, 44 Kemik iliği hastalığı olmayan, 15 polistemia vera ve 17 normal kişiden araştırma yapıldığında; vizual görüntüleme ile; MMM hastalarının %70'inde, polistemia veralı hastaların %33'ünde, idiopatik trombositopenik purpura hastalarının %12 ve normal hastaların %0'ında grade-3 veya 4 anjiogenezisin olduğu saptanmıştır. Ayrıca multivaryans analizlerinde; MMM'de artmış anjiogenezisin dalak büyüklüğü ve toplam hayatta kalım ile ilişkili olduğu saptanmıştır⁵⁷.

Lenfomalı vakalardaki anjiogenezis ile ilgili birçok çalışma vardır. Yüksek grade Hodgkin-dışı lenfoma (NHL) hastalarında ve ilerleyici mikozis fungoideste lenf nodu ve deri biyopsilerinde artmış kapiller proliferasyon gösterilmiştir^{58,59}. Son çalışmalarda ise bFGF ve VEGF konsantrasyonları ile yüksek grade NHL hastalarında pozitif korelasyon bulunulmuştur. İleri grade NHL 160 hastanın lenf nodu biyopsileri ile tedavi öncesi yüksek serum bFGF düzeyi, large diffüz ve immünoblastik lenfomada kötü prognoz ile ilişki kurulmuştur. Multivariant çalışmalarda yüksek serum bFGF düzeyinin ekstranodal tutulumu olan NHL hastalarının seyri sırasında LDH dan daha bilgi verici prognostik gösterge olduğu gösterilmiştir⁶⁰. Lenfoma uluslararası prognostik kriterlerle serum bFGF bakılarak yapılan çalışmada ileri grade NHL hastalarında yüksek bFGF düzeyi (>5.5 pg/ml) bulunmuş ve kötü prognozu gösterdiği yorumu yapılmıştır⁶⁰. Benzer ilişki serum VEGF ile NHL ile de gösterilmiştir⁶¹. Gerçekten de bFGF düzeyi ekstranodal tümörü olan hastalarda LDH'dan daha fazla bilgi vermiştir. Benzer olarak çok farklı meme kanseri çalışmasında MVD'nin lenf nodu metastazı olmayan hastalarda tümör büyüklüğü, tümör grade, östrojen reseptör pozitifliği veya diğer prognostik göstergelerden daha iyi bir metastaz göstergesi olduğu gösterilmiştir⁶².

Anti-anjiogenik tedavi

Hemanjiomalar yenidoğan döneminde 100 bebekten birinde görülür ve bu hastaların beşte biri 1000 gr'ın altındaki bebeklerdir. Bu tümörler hızla ilk

bir yıl içinde büyür (proliferatif dönem) sonraki beş yıl içinde regrese olur (involyasyon dönemi) ve 5-10 yaşları arasında çoğunlukla kaybolur. Çoğu için tedaviye ihtiyaç yoktur. Seyrek olarak hemanjiom tedavi ile akselere döneme girer ve büyür. Kortikosteroid tedavisinin yetersizliğinde hayat kurtarıcı olan radyoterapi, siklofosfamid tedavisi ve embolizasyondur⁶³.

Çoğu doğal ve sentetik inhibitörle faz-1 ve faz-2 çalışması devam etmektedir. Bunlar doku metalloproteinaz inhibitörleri (TIMP-1 ve 2), anti-VEGF, trombosit derived inhibitör faktör, interferon-alfa, IL-1, IL-12, TNF-alfa, retinoik asid, talidomid, integrin antagonisti (vitaxin- α V β 3) endostatin ve angiostatindir. Preklinik ve hayvan çalışmalarında anjiogenezis inhibitörlerinin yeni kan damarı oluşumunu bloke etmeleri veya tümör hücre tahribi ile etkilerinden şüphelenilmektedir. Ancak bu tedavi yaklaşımlarının daha az toksik olması, miyelosüpresyon, saç kaybı, gastrointestinal semptomları ve ilaç dirençliliği yapmaması için çalışmalar devam etmektedir⁶⁴.

Antianjiogenezis tedavisi günlük veya intermittant uzun süreli tümör kontrolünde kullanılmaya çalışılmaktadır. Tek başına veya sitotoksik tedavi ile beraber uygulama çalışmaları devam etmektedir. Sitotoksik tedavi ile bazı deneysel çalışmalarda tam tedaviye yol açtığı gösterilmiştir⁶⁵⁻⁶⁷.

Rekombinan human monoklonal anti-VEGF antikoru farklı solid tümörlü hastaların tedavisinde kullanılmıştır. Faz-1 çalışmasından sonra 25 hastaya dört doz anti-VEGF 0.1-10 mg/kg intravenöz olarak 90 dakikada 0, 28, 35, 42. günde verildiğinde takip eden dönemde bir renal-hücreli tümörlü hastada tümör kitlesinde %39 küçülme ve tümöre bağlı kanama epizodunda azalma görülmesinin dışında çok az bir objektif düzelme görülmüştür⁶⁸.

Laboratuvar çalışmaları sonrası interferon-alfa 2a'nın antianjiogenik etkisi belirlendikten sonra yedi yaşındaki bir hayati tehdit eden pulmoner hemanjiom vakasında güvenle kullanılmış ve başarılı olunmuştur. Ayrıca geniş doku yıkımı yapan, hayati organlara yerleşmiş olan 20 vakadan 18 tanesi hızla regresyon göstermiştir⁶⁹. Ancak bazı çocuklarda spastik dipleji tanımlanmıştır. Ancak interferon alfa-2a ile kortikosterid tedavisiyle kombinasyonunda toksik etkilerinde azalma gözlemlenmemiştir. İnterferon alfa-2a'nın insan tümör hücrelerinde FGF'yi süprese ettiği gösterilmiştir⁷⁰.

Preklinik çalışmalarda deodenal ülser iyileşmesini bFGF'nin yaptığı kanıtlanmıştır. Faz-1

çalışmalarından sonra gastrik veya deodenal ülserli tedaviye dirençli hastalarda çalışılabilir. Bir çalışmada non-steroidal antiinflamatuvar tedaviye (NSAID) bağlı gastrik ülser oral b-FGF'le düzelmiştir. Ayrıca bFGF hemen hemen bir milyon kez histamine bağlı H₂ blokajı yapmakta ve gastrik asit düzeyini düşürmemektedir. Antiülser tedavisinden ilginç olan sucralfate endojen mukozal bFGF'yi korumaktadır⁷¹.

NM-3 ile yapılan çalışmalarda in vitro olarak tek başına endotelial tüp oluşumunu gelişimini engellediği ve kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonunda antineoplastik ajanların etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir⁷².

Celecoxib tarafından COX-2 inhibisyonunun bFGF-2'yi indükleyerek neovaskülarizasyonu inhibe ettiği, hayvan çalışmasında ise PgE₂ ve TxB₂'yi azalttığı gösterilmiştir⁷³.

Anti-VEGF ve mitomisin-C (MMC) primer gastrik tümör büyümesini ve metastazını inhibe etmiş, kombinasyonu tek ajan kullanımından daha etkili bulunmuştur⁷⁴.

Son olarak endostatin ve angiostatin kombinasyonun fare AC Lewis tümör tedavisinden iyi sonuç alındığı ifade edilmiştir⁶⁵. Ancak endostatinin insan için çalışmaları devam etmektedir. Amerikan Kanser Enstitüsü (NCI) iki merkezde faz-1 çalışmasını ilerlemiş solid tümör; lenfoma, akciğer, prostat, kolon ve meme kanserinde izin vermiştir².

Hematolojik malignansilerdeki antianjiogenik tedavi kullanımı ilginç ama tedavinin sonucunu değerlendirmek güç bulunmuştur. Bazı multipl miyelomalı hastalarda talidomid ile ilgili cesaret verici çalışmalar vardır⁷⁵. Bir çalışmada talidomid ve alfa interferon kombinasyonunun kullanımı ile multipl miyelomalı hastalarda maksimum cevap alınmış ve toplam yaşam süresini arttırmıştır⁷⁵.

Ayrıca ilerlemiş kanser vakalarında trombosit faktör-4, carboxyaminotriazole, BB-94 ve BB-2516, metalloproteinaz inhibitörleri, sulfatlanmış polysaccaride tecogalan (DS-4152) ve linomide araştırılmaktadır. Angiogenesis inhibitörlerinin kan-beyin engelini geçemedikleri gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda antianjiogenik ilaçlara karşı direnç gelişiminde kararlı kombinasyon tedavilerinin yararlı olduğu fikri ortaya atılmıştır⁷⁶.

Sonuç

Anjiogenezis değerlendirilmesinde laboratuvar incelemelerinde bazı faktörlerin ve klinik tablonun derecesi de göz önüne alınmalıdır.

Megakaryosit sayısı yüksekliğinde ise: UEA-1, CD31, FVIIIr Ag; kemik iliği fibrozisti durumda UEA-1, CD31; eritroid hiperplazi varlığında UEA-1; artmış myelomonositik hücre varlığında ise CD34 yüksek olarak yorumlanmaktadır².

Serum veya idrar FGF ve VEGF düzey yüksekliği; artmış endotelial aktivite, enfeksiyon, doku yıkımı, enflamasyonda ve ayrıca; normal hücre içeren aktive makrofaj, renal glomerüler epitelyal ve mesengial hücrelerde, keratinositlerde de gösterilmiştir. ALL ve KLL hastalarındaki yüksek bFGF; yüksek tümör yıkımı ve araya giren enfeksiyonları veya enflamatuvar olaya bağlanabilir².

Anjiogenezis tümör büyümesinde, yayılmasında ve metastazında anahtar rolü oynamaktadır. Bu solid tümörlerde özellikle; melanoma, over, akciğer, kolon, prostat, beyin tümör ve bazı lenfomalarda çok iyi gösterilmiştir. Hematolojik malignansilerde anjiogenik aktivite ölçümü (MVD) vizual ve komputerize ölçüm gerektirmektedir.

Kemik iliği biyopsilerinde anjiogenezis belirlenmesinde; hematoksilen eosin boyama, immunboyama: CD31, CD34, UEA-1, FVIIIr-Ag, policlonal FVIIIr-Ag gibi birçok teknik kullanılmaktadır².

Birçok ALL, MDS, AML, multipl miyeloma, NHL ve KLL ile yapılmış çalışma vardır. Bunlarda artmış anjiogenezis ile sitogenetik, translokasyon, immünofenotipik veri, onkojenik aktivite ve nokta mutasyonla arasında korelasyonda eksiklikler vardır. Artmış anjiogenezis ile remisyon hızı, hastalısız yaşam süresi ve toplam yaşam süresi ile ilgili çalışma yoktur. Güzel planlanmış preklirik çalışmalarda antianjiogenik terapi ile tümör büyümesinin durakladığı ve tedavisi gösterilmiştir². Ancak bu preklirik çalışmalardan sonra klinik çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Nie D, Tang K, Diglio C, Kennth VH. Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxigenase. *Blood* 2000; 95: 2304-2311.
- Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000; 111: 43-51.
- Bruyn PP, Breen PC, Thomas TB, et al. The microcirculation of the bone marrow. *Anat Rec* 1970; 168: 55-68.
- Mangi MH, Layton DM. The cells of human yolk sac blood island express CD 34 and produce GM-CSF. *Blood* 1994; 84: 268a.
- Palis J, McGrath KE, Kinsley PD. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac. *Blood* 1995; 86: 156-163.
- Clark ER, Clark EL. Microscopic observation on the growth of blood capillirs in the living mammals. *Am J Anat* 1939; 64: 251-299.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation. What is molecular basis. *Cell* 1996; 87: 1153-1155.
- Cine DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-3561.
- Nicosia RF. What is the role of vascular endothelial growth factor related molecules in tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 1998; 153: 11-16.
- Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 1999; 103: 157-158.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Biol* 1995; 11: 73-91.
- Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis and growth factors; ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998; 93: 661-664.
- Shi Q, Rafi S, Wu MHD, et al. Evidence for circulation bone marrow derived endothelial cell. *Blood* 1998; 92: 362-367.
- Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995; 376: 70-74.
- Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
- Vikkula M, Boou L, Carraway K, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase. *Cell* 1996; 87: 1181-1191.
- Kini AR, Peterson LC, Tallman MS, Lingen MW. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001; 97: 3919-3924.
- Lange-Asschenfeldt B, Weninger W, Velasco P, et al. Increased and prolonged inflammation and angiogenesis in delayed-type hypersensitivity reactions elicited in the skin of thrombospondin-2- deficient mice. *Blood* 2002; 99: 538-545.
- Ong S, Lash G, Boker PN. Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14: 969-980.
- Ishihara K, Hayash I, Yamashina S, Majima M. A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *Jpn J Pharmacol* 2001; 87: 318-326.
- Oda H, Ogata Y, Shirouzu K. The effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 against postoperative lung metastasis following removal of orthotopic transplanted human colon cancer: an experimental study. *Krume Med J* 2001; 48: 285-93.
- Reimer CL, Agata N, Tamman JG, et al. Antineoplastic effects of chemotherapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 789-795.
- Rajkumar SV. Current status of thalidomide in the treatment of cancer. *Oncology* 2001; 15: 867-874.
- Munshi NC. Arsenic trioxide: an emerging therapy for multiple myeloma. *Oncologist* 2001; 6 (Suppl) 2: 17-21.

25. Waxman S, Anderson KC. History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *Oncologist* 2001; Suppl 2; 3-10.
26. Okada M, Ogasawara, Sekine K, Seno C, Nishikawa K. Antiangiogenic and antimetastatic effects of toremifene citrate. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001; 28: 1099-1104. [Article in Japanese].
27. Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA, et al. Requirement of vascular integrin α V β 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-571.
28. Cheresch DA. Death to a blood vessel, death to a tumor. *Nature Med* 1998; 4: 395-396.
29. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, et al. Integrin α V β 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994b; 79: 1157-1164.
30. Stromblad S, Becker JC, Yerba M, et al. Suppression of p53 and p21 expression by vascular cell integrin β V α 3 during angiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 1996; 98: 426-433.
31. Ruegg C, Yılmaz A, Bieler G, et al. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin V β 3 in the disruption of the tumor vasculature induced by tumor necrosis factor and interferon-gamma. *Nature Med* 1998; 4: 408-414.
32. Fallowfield ME, Cook MG. Lymphatics in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 370-374.
33. Salven P, Lymboussaki A, Jaaskela-Saari H, et al. Vascular endothelial growth factor VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol* 1998; 153: 103-108.
34. Valtola R, Salven P, Heikkilä P, et al. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1381-1390.
35. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94: 3717-3721.
36. Koch AE, Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularisation by activated human monocytes. *J Leuk Biol* 1986; 39: 233-238.
37. Brunner G, Nguyen H, Gabrielove J, et al. Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993; 81: 631-638.
38. Gaudry M, Bergere O, Andrieu V, et al. Intracellular pool of VEGF in human neutrophils. *Blood* 1997; 90: 4153-4161.
39. Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, et al. Release of the angiogenic cytokines vascular endothelial growth factor. (VEGF) from platelets: significance for VEG measurements and cancer biology. *Br J Cancer* 1999; 77: 956-964.
40. Salven P, Orpana A, Joensuu H. Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 487-491.
41. Vermeulan PB, Salven P, Benoy I, et al. Blood platelets and serum VEGF in cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 370-371.
42. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 309-313.
43. Padro T, Ruiz S, Bieker R, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-2644.
44. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 815-821.
45. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Hayer DF, Folkman J. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 356-361.
46. Yetgin S, Yenicesu I, Cetin M, Tuncer M. Clinical importance of serum vascular endothelial and basic fibroblast growth factors in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 83-88.
47. Aguayo A, Kantarjian H, Talpaz M, et al. Increased angiogenesis in chronic myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 1998; 92: 607a.
48. Kini AR, Peterson LC, Kay NE. Evidence for abnormal angiogenesis in the bone marrow of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1998; 92: 716a.
49. Feidler W, Graeven U, Ergun S, et al. Vascular endothelial growth factor a possible paracrine growth factor: in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89: 1870-1875.
50. Aguayo A, Kantarjian H, Manshoury T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-2245.
51. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, et al. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 94: 3717-3721.
52. Vacca A, DiLoreto M, DiStefano R, et al. Bone marrow of patients with multiple myeloma: angiogenesis and plasma cell adhesion molecules LFA-1, VLA-4, LAM-1 and CD44. *Am J Hematol* 1995; 50: 9-14.
53. Rajkumar SV, Fonseca R, Witzig TE, et al. Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma. *Leukemia* 1999; 13: 469-472.
54. Mangi MH, Newland AC. Increased angiogenesis in chronic myelomonocytic leukemia. Biologic and clinical implications. *Br J Haematol* 1999; 105: 68a.
55. Hayashibara T, Fujimoto T, Miyanishi T, et al. Vascular endothelial growth factor at high plasma levels is associated with extranodal involvement in adult T cell leukemia patients. *Leukemia* 1999; 13: 1634-1635.
56. Munchi N, Wilson CS, Penn J, et al. Angiogenesis in new diagnosed multiple myeloma: poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies. *Blood* 1998; 92: 98a.
57. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, et al. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2000; 96: 3374-3380.

58. Vacca A, Moretti S, Ribatti D, et al. Progression of mycosis fungoides with changes in angiogenesis and expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1685-1692.
59. Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. Angiogenesis spectrum in the stoma of B cell NHL. An immunohistochemical and ultrastructure study. *Eur J Haematol* 1996; 56: 45-53.
60. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; 90: 3167-3172.
61. Salven P, Teerenhovi L, Joensuu H. A high pretreatment serum basic fibroblast growth factor concentration is an independent predictor of poor prognosis in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3334-3339.
62. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995; 147: 9-19.
63. Enjolras O. Management of hemangiomas. *Dermatol Nur* 1997; 9: 11-17.
64. Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-407.
65. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 227-285.
66. Holmgren L, O'reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastasis, balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1995; 1: 149-153.
67. Teicher BA, Holden SA, Ara G, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other antiangiogenic agents. *Inter J Cancer* 1996; 57: 920-925.
68. Gordon MS, Talpaz K, Margolin E, et al. Phase I trial of recombinant humanized monoclonal antivascular endothelial growth factor ANTI-VEGF mab in patients with metastatic cancer. *J Clin Oncol* 1998; 17: 210a.
69. Ezekowitz RA, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alfa-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 1992; 326: 1456-1463.
70. Singh Rk, Gutman M, Bucano CD, et al. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4562-4266.
71. Esaki M, Aoyagi K, Matsumoto T, et al. Effects of omeprazole and famotidine on fibroblast growth factor-2 during artificial gastric ulcer healing in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 365-369.
72. Reimer CL, Agata N, Tamman JG, et al. Antineoplastic effects of chemotherapeutic agents are potentiated by NM-3, an inhibitor of angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 789-795.
73. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 625-631.
74. Tao H, Lin Y, Yin H, et al. Effect of anti-vascular endothelial growth factor antibody on the progression of human gastric cancer orthotopic xenotransplanted into nude mice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1999; 37: 248-250, [Article in Chinese].
75. Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *New Engl J Med* 1999; 341: 1565-1571.
76. Karbel RS, Yu J, Tran J, et al. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 20: 79-86.